



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁷ : A61K	A2	(11) International Publication Number: WO 00/03683 (43) International Publication Date: 27 January 2000 (27.01.00)
(21) International Application Number: PCT/US99/16166 (22) International Filing Date: 16 July 1999 (16.07.99) (30) Priority Data: 60/093,481 20 July 1998 (20.07.98) US (71) Applicant (for all designated States except US): INEX PHARMACEUTICALS CORPORATION [US/US]; Glenyon Business Park, 100-8900 Glenlyon Parkway, Burnaby, British Columbia V6K 3S4 (CA). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): BOEY, Anthony [CA/CA]; 419-2551 Parkview Lane, Port Coquitlam, British Columbia V3C 6J8 (CA). CHEN, Tao [CA/CA]; 9-7711 Minom Boulevard, Richmond, British Columbia V6A 1Z3 (CA). LENG, Esther [CA/CA]; 14136 88th Avenue, Surrey, British Columbia V3W 3L6 (CA). TARD, Paul, G. [CA/CA]; 19081 Sundale Court, Surrey, British Columbia V3S 7M6 (CA). WHEELER, Jeffrey, J. [US/CA]; 6179 17A Street, Surrey, British Columbia V34 8G9 (CA). SCHERRER, Peter [CH/CA]; 2664 Birch, Vancouver, British Columbia V6H 2T5 (CA). GRAHAM, Roger [CA/CA]; 2638 West 7th Avenue, Vancouver, British Columbia V6K 1Z1 (CA).		(74) Agents: SNYDER, Joseph, R. et al.; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, 8th floor, San Francisco, CA 94111-3834 (US). (81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
(54) Title: LIPOSOMAL ENCAPSULATED NUCLEIC ACID-COMPLEXES		
(57) Abstract This invention relates to liposomes which are useful for the introduction of nucleic acids into cells. The liposomes of the present invention entrap a condensing agent-nucleic acid complex and are suitable for nucleic acid-transfer delivery vehicles in clinical use. In addition, methods of transfecting a cell with a nucleic acid using the liposomes of the present invention are also disclosed.		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2002-520038
(P2002-520038A)

(43) 公表日 平成14年7月9日 (2002.7.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 9/127	4 B 0 2 4
A 6 1 K 9/127		31/7088	4 C 0 7 6
31/7088		47/32	4 C 0 8 4
47/32		47/42	4 C 0 8 6
47/42		48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 63 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-559818(P2000-559818)
(86) (22) 出願日 平成11年7月16日 (1999.7.16)
(85) 翻訳文提出日 平成13年1月22日 (2001.1.22)
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 1 6 1 6 6
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 0 3 6 8 3
(87) 国際公開日 平成12年1月27日 (2000.1.27)
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 9 3 , 4 8 1
(32) 優先日 平成10年7月20日 (1998.7.20)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 アイネックス ファーマシューティカルズ
コーポレーション
カナダ国 ブイ5ジェイ 5ジェイ8 プ
リティッシュ コロンビア, バーナビ
ー, グレンリオン ビジネス パーク,
グレンリオン パークウェイ 100-
8900

(72) 発明者 ボウイ, アンソニー
カナダ国 ブイ3シー 6ジェイ8 プリ
ティッシュ コロンビア, ポート コキ
ットラム, パークビュー レーン 419
-2551

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボソームカプセル化核酸複合体

(57) 【要約】

本発明は、細胞への核酸の導入のために有用なリボソームに関する。本発明のリボソームは、凝縮剤-核酸複合体を包含し、そして臨床使用において核酸-移入送達ビヒクルに適切である。さらに、本発明のリボソームを用いて細胞を核酸でトランスフェクトする方法が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リボソームであって、以下：

(a) 脂質；および

(b) 該リボソームにカプセル化される凝縮剤-核酸複合体、

を含有する、リボソーム。

【請求項2】 以下：

(c) 前記リボソームに会合する二重層安定化成分、

をさらに含む、請求項1に記載のリボソーム。

【請求項3】 前記脂質が非カチオン性脂質を含む、請求項1に記載のリボソーム。

【請求項4】 前記凝縮剤が、ポリエチレンイミン、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、ヒストン、プロタミン、ポリアミン、スベルミジンおよびスベルミンからなる群より選択されるメンバーである、請求項1に記載のリボソーム。

【請求項5】 前記凝縮剤が約0.8 kDa～約800 kDaの分子量を有するポリエチレンイミンである、請求項4に記載のリボソーム。

【請求項6】 前記凝縮剤-核酸複合体が約30 nm～約60 nmの直径である、請求項1に記載のリボソーム。

【請求項7】 前記リボソームが約20 nm～約200 nmの直径である、請求項1に記載のリボソーム。

【請求項8】 前記リボソームが約50 nm～約150 nmの直径である、請求項1に記載のリボソーム。

【請求項9】 前記リボソームが約70 nm～約80 nmの直径である、請求項8に記載のリボソーム。

【請求項10】 前記二重層安定化成分が、脂質、脂質誘導体、界面活性剤、ポリエチレングリコール、タンパク質、ペプチド、ポリアミドオリゴマー、pH感受性ポリマーおよびPEG脂質からなる群より選択されるメンバーである、請求項2に記載のリボソーム。

【請求項11】 前記PEG脂質がPEG-セラミドである、請求項10記

載のリボソーム。

【請求項12】 前記PEGが約2000～約5000ダルトンの平均分子量を有する、請求項11に記載のリボソーム。

【請求項13】 前記凝縮剤-核酸複合体における前記ポリエチレンイミン：核酸の重量比が約10：1～約1.5：1である、請求項5に記載のリボソーム。

【請求項14】 前記カプセル化された凝縮剤-核酸複合体がピコグリーンおよび硫酸デキストランを用いて決定される場合、約30%を超えるカプセル化効率を示す、請求項1に記載のリボソーム。

【請求項15】 細胞を核酸でトランスフェクトする方法であって、該方法は、前記細胞を、以下：

(a) 脂質；および

(b) リボソームにカプセル化される凝縮剤-核酸複合体、
を含有する該リボソームと接触させる工程、を包含する、方法。

【請求項16】 細胞を、請求項15に記載の核酸でトランスフェクトする方法であって、前記リボソームが、以下：

(c) 該リボソームに会合する二重層安定化成分、
をさらに含む、方法。

【請求項17】 細胞を、請求項15に記載の核酸でトランスフェクトする方法であって、前記リボソームが約70nm～約80nmの直径である、方法。

【請求項18】 請求項16に記載の細胞への核酸のトランスフェクト方法であって、前記二重層安定化剤がPEG-セラミドである、方法。

【請求項19】 リボソーム中に凝縮剤-核酸複合体をカプセル化するための方法であって、該方法は、以下：

凝縮剤溶液を核酸溶液に添加し、凝縮剤-核酸複合体を形成する工程；および
該凝縮剤-核酸複合体を脂質懸濁液に添加し、カプセル化された凝縮剤-核酸複合体を形成する工程、
を包含する、方法。

【請求項20】 請求項19に記載のリボソーム中に凝縮剤-核酸複合体を

カプセル化するための方法であって、該凝縮剤-核酸複合体は、第1の凝縮剤を混合して予め凝縮された核酸を形成すること、次いで、該予め凝縮された核酸を第2の凝縮剤溶液に添加し、該凝縮剤-核酸複合体を形成することにより形成され、ここで該第1の凝縮剤および該第2の凝縮剤は同じであるか、または異なる、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、細胞への核酸の導入のために有用であるリボソームに関する。より詳細には、本発明のリボソームは、凝縮剤-核酸複合体を包含し、従って、臨床使用において核酸移入送達ビヒクルとして有用である。

【0002】

(発明の背景)

細胞への外来遺伝子および他の分子の導入は、分子生物学者にとって大きな関心事である。細胞へ遺伝物質を導入する理由の1つはコードされたタンパク質を発現することである。遺伝子移入は、標的細胞への核酸の送達工程、次いで治療の様式において機能し得る形態で細胞膜を横切って核酸を移入する工程を含む。真核生物細胞へのDNAの進入を容易にするために使用される多くの方法のうち、最も有効なものがリボソームであり、そしてトランスフェクト実験においてDNAキャリアとして広い用途を見出している。カチオン性脂質が、ポリヌクレオチドに結合すること、そして哺乳動物細胞への細胞内送達を容易にすることが公知である。核酸は、陰性に荷電されており、そして陽性に荷電された脂質と組み合わせた場合、処方物および細胞送達に適切である複合体を形成する。トランスフェクトのためのカチオン性脂質キャリアの使用は十分確立されている。

【0003】

研究下の他の遺伝子移入方法としては、ウイルスベクターが挙げられる。ウイルスベクターは、細胞膜を横切って核酸を輸送し、そしてある場合には染色体へ外来DNAを組み込む固有の能力を有するが、ウイルスベクターは限られた量のDNAしか運搬し得ず、そしていくつかの危険性を提示し得る。このような危険性の1つは、患者の染色体へのウイルス遺伝子配列の無作為な組み込みを含む。これは、潜在的にゲノムを損傷し、そしておそらく悪性の形質転換を誘導する。別の危険性は、ウイルスベクターが変異または野生型ウイルスとの遺伝子交換のいずれかを通じて病原性の遺伝子型に復帰し得ることである。

【0004】

ウイルス遺伝子送達系に関する制限は、非ウイルス性の遺伝子移入ベクターの開発を引き起こしてきた。これらの非ウイルス系は、一般に、核酸を凝縮し、そして細胞膜への核酸の細胞性取り込みを容易にするため、カチオン性因子（例えば脂質またはポリマー）に複合体化されたプラスミドDNAからなる。遺伝子発現の障壁の1つは、細胞質内の核への経路におけるDNAの変性である。これに関して、ポリカチオンは、この障壁に打ち勝ち、そして遺伝子発現を改善するために広範に使用されてきた。これらのカチオン性ポリマーとしては、グラミジシンSのような抗生物質、デンドリマーもしくはカスケードポリマーまたはカチオンの改変されたアルブミンが挙げられる。さらにスベルミジンがDNAを凝縮し、そして細胞培養物のトランスフェクトを改善することが見出されてきた。これらの凝縮剤は、DNAを、エンドヌクレアーゼおよび制限酵素による分解から保護する。これらのポリマー上の陽性荷電はまた、複合体の転移能力をブーストすると予期される。

【0005】

核酸に静電的に結合する親和性により、凝縮剤として有用である他のポリカチオン性ポリマーとしては、ポリリジン、ポリアルギニンおよびポリオルニチンが挙げられる。高度に分枝したポリマーであるポリカチオンポリエチレンジイミン（PEI）は、非常に効率的な遺伝子送達剤であることが示されている。この点に関して、PEIは、核酸を非常に緻密な形態に凝縮し、そして種々のヌクレアーゼに対する良好な防御を提供する。これらの複合体を用いての遺伝子移入が特定の条件下で1000倍までブーストされることが報告されている。明らかに、PEIのようなポリカチオンは、この点に関して脂質／核酸複合体よりも明白な利点を有する。

【0006】

しかし、ポリカチオン性核酸複合体、例えばPEI-核酸複合体の1つの有意な欠点として、このような複合体の使用を介するインビボ遺伝子送達に関係する毒性がある。PEIが核酸とより高率で凝縮される場合、複合体は毒性となる。より低率（約2）では、トランスフェクション（形質導入）は有意に低下する。これらの高度に移入する粒子を移入のためにインビボで使用する場合、毒性を耐

耐容性レベルへ低下させなければならない。

【0007】

従って、遺伝物質の細胞内送達を容易にするために有効であるが、関連する細胞毒性を減少する、凝縮剤-核酸複合体を設計する必要がある。本発明は、この必要性および他の必要性を満たす。

【0008】

(発明の要旨)

一つの局面において、本発明は、以下を有するリボソームに関する：(a) 脂質；および(b) カプセル化された凝縮 (condensing) 剤-核酸複合体。特定の好ましい局面において、本発明のリボソームはさらに、以下を含む：(c) 二重層安定化成分。この二重層安定化成分は、リボソームと逆に会合し得る。このようなりボソームは、非常に有利である。なぜなら、これらは、カプセル化によって保護されていない核酸を分解する傾向にある種々のヌクレアーゼからの、その核酸に対する良好な保護を提供するからである。さらに、多くの場合において、これらの複合体を用いた遺伝子移入は、1000倍にまで増加する。さらに、本発明のカプセル化処方物を用いてその凝縮剤の毒性を、寛容可能なレベルにまで減少させる。

【0009】

本発明における使用のために適切な凝縮剤は、以下を含むがそれらに限定されない：ポリカチオンポリマー（例えば、ポリエチレンイミン、ポリリジン、ポリアルギニンおよびポリオルニチン）。核酸について親和性を有し、そして本発明における使用に適切な他の凝縮剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：ポリカチオン性の天然のDNA結合タンパク質（例えば、ヒストンおよびプロタミンまたはそれらのアナログもしくはフラグメント）。本発明における使用に適切な他の凝縮剤としては、スベルミジン、スベルミン、ポリカチオン（2以上の異なる正に荷電したアミノ酸を有する）または塩基性タンパク質が挙げられる。

【0010】

多くの脂質が使用され得るが、本発明のリボソームにおいて使用される脂質は

、好ましくは非カチオン性脂質である。そのような非カチオン性脂質としては、セラミド、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンおよびそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。現在好ましい実施態様において、使用される非カチオン性脂質は、セラミド、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルセリンおよびそれらの混合物である。

【0011】

別の局面において、本発明は、リボソーム中に凝縮剤-核酸複合体をカプセル化するための方法に関する。この方法は、核酸溶液中に凝縮剤溶液を添加して凝縮剤-核酸複合体を形成する工程；およびその凝縮剤-核酸複合体を脂質懸濁物に添加してカプセル化された凝縮剤-核酸複合体を形成する工程を包含する。好ましい実施態様において、その方法は以下の工程：

- (a) 核酸溶液に第一の凝縮剤溶液を混合して予備凝縮核酸を形成する工程；
 - (b) 第二の凝縮剤溶液にその予備凝縮した核酸を添加して凝縮剤-核酸複合体を形成する工程；
 - (c) その凝縮剤-核酸複合体を透析して、濃縮された凝縮剤-核酸複合体を形成する工程；
 - (d) その濃縮された凝縮剤-核酸複合体を、界面活性剤を含む脂質懸濁物に添加する工程；および
 - (e) その脂質懸濁物からその界面活性剤を除いてそのリボソーム中にカプセル化された凝縮剤-核酸複合体を形成する工程、
- を包含する。

【0012】

この方法において、第一の凝縮剤と第二の凝縮剤とは、同一であり得るか異なり得る。

【0013】

さらに別の局面において、本発明は、核酸を用いて細胞をトランスフェクトする方法に関する。この方法は、(a) 脂質；および(b) カプセル化された凝縮剤-核酸複合体を有するリボソームとその細胞を接触させる工程を包含する。特

定の好ましい実施態様において、この方法のリボソームは、さらに、(c) 二重層安定化成分を含む。この二重層安定化成分は、そのリボソームと逆に会合し得る。

【0014】

なおさらに別の局面において、本発明は、疾患の処置に関する。この処置は、核酸を用いて細胞をトランスフェクトすること、およびアンチセンスヌクレオチドを細胞に導入すること、ならびに生存細胞のゲノムに取り込まれるように操作したDNAで細胞を安定にトランスフェクトすることを包含する。

【0015】

本発明およびその好ましい実施態様の他の特徴、目的および利点は、以下の詳細な説明から明らかである。

【0016】

(好ましい実施態様の説明)

(A. 語彙)

用語「脂質」とは、その脂質物質の疎水性部分とその二重層に向けて配向され一方、親水性部分が水相に向けて配向されているような、二重層を生じる任意の物質をいう。両親媒性脂質は、親水性部分および疎水性部分を有する。親水性の特徴は、ホスファト基、カルボキシル基、スルファト基、アミノ基、スルフヒドリル基、ニトロ基などの存在から生じる。疎水性は、以下を含むがそれらに限定されない基を内包することによって付与され得る：長鎖の飽和および不飽和の脂肪族炭化水素基ならびに1つ以上の芳香族、環式脂肪族または複素環式基によって置換されたそのような基。両親媒性化合物としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：ホスホグリセリドおよびスフィンゴ脂質。これらの代表例としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジバリティルホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリンまたはジリノレイルホスファチジルコリンが挙げられる。リンを欠く他の化合物（例えば、スフィンゴ脂質およびグリコフ

インゴ脂質のファミリー) もまた、脂質と称するグループ内にある。さらに、上記の両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールを含む他の脂質と混合され得る。

【0017】

用語「中性脂質」とは、生理的pHで非荷電または中性の双性イオンのいずれかの形態で存在する多数の脂質種のいずれかをいう。そのような脂質としては、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリンおよびセレブロシドが挙げられる。

【0018】

用語「非カチオン性脂質」とは、上記の中性脂質のいずれかおよびアニオン性脂質をいう。好ましい非カチオン性脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンおよびセラミドが挙げられる。好ましいアニオン性脂質としては、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン(N-スクシニルPE)、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロールおよびホスファチジルエチレングリコールが挙げられる。

【0019】

用語「カチオン性脂質」とは、生理的pHにおいて正味の正電荷を有する多数の脂質種のいずれかをいう。そのような脂質としては以下が挙げられるがそれらに限定されない: DODAC、DOTMA、DDAB、DOTAP、DC-CholおよびDMRIE。さらに、カチオン性脂質の市販の調製物は多数存在する。これらとしては、例えば、以下が挙げられる: LIPOFECTIN (登録商標) (GIBCO/BRL、Grand Island、New York、USAからの、DOTMAおよびDOPEを含む、市販のカチオン性リポソーム); LIPOFECTAMINE (登録商標) (GIBCO/BRLからの、DOSPAおよびDOPEを含む、市販のカチオン性リポソーム); およびTRANSFECTAM (登録商標) (Promega Corp.、Madison、Wisconsin、USAからの、エタノール中にDOGSを含む市販のカチ

オン性脂質)。

【0020】

本明細書において使用される用語「二重層安定化成分」とは、生理的条件下で非ラメラ相をとる脂質を二重層構造において安定化させる化合物(例えば、脂質、ポリマーなど)をいう。二重層安定化成分は、それ自体も二重層を形成するか、または相補的な力学的形状であるかのいずれかである。非二重層形成脂質は、二重層安定化成分と会合する(すなわち、その存在下にある)場合その二重層構造において安定化される。特定の実施態様において、二重層安定化成分は、リボソームの外へ移動し得るか、内因性系によって化学的に改変され得、その結果、経時的に、二重層構造において脂質を安定化するその能力を欠失する。リボソーム安定性が欠失するか、不安定化されるか、または減少する場合、融合が生じ得る。融合は、その標的細胞へのリボソーム負荷の放出を生じ得る。したがって、特定の実施態様において、二重層安定化成分は、脂質と「可逆的に会合」し、そして脂質と会合する場合、その脂質は、そうでなければ非ラメラ相を採る条件下で二重層構造を採るように拘束される。それ自体、本発明の二重層安定化成分は、二重層構造においてその脂質を安定化し得るが、なお、リボソームから交換されて出てき得るか、または内因性系によって化学的に改変され得、その結果、経時的に、二重層構造においてその脂質を安定化するそれらの能力を欠失し、それによって、そのリボソームを、融合性にさせるか、またはその負荷を放出させる。

【0021】

特定の他の実施態様において、二重層安定化成分は、リボソームから外へ移動しない。これらの実施態様において、このリボソームは、非融合性であり、そしてその二重層安定化成分は、その脂質と「可逆的に会合」しない。

【0022】

本明細書において使用される用語「トランスフェクション」とは、ポリアニオン性物質、特に核酸の、細胞への導入をいう。用語「リボフェクション」とは、脂質と会合したそのような物質の導入をいう。ポリアニオン性物質は、DNAまたはRNAの形態であり得、これは、細胞への進入の後、遺伝子発現を容易にす

る発現ベクターと連結されている。したがって、本発明において使用されるポリアニオン性物質は、構造タンパク質、レセプターおよびホルモンのためのコード配列ならびに転写調節エレメントおよび翻訳調節エレメント（すなわち、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターおよびシグナル配列）ならびにベクター配列を有するDNAを含むことが意味される。特定の核酸を発現ベクターに組み込む方法は、当業者に周知であるが、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版）、第1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory,（1989）またはCurrent Protocols in Molecular Biology、F. Ausubelら編、Greene Publishing and Wiley-Interscience、New York（1987）（これらは、両方とも、本明細書において参考として援用される）に詳細に記載されている。

【0023】

「発現ベクター」、「クローニングベクター」または「ベクター」とは、しばしば、選択された宿主細胞において複製し得るプラスミドまたは他の核酸分子である。発現ベクターは、自律的に複製し得るか、またはそれらは、当該分野で周知の方法によって宿主細胞のゲノムに挿入されることによって複製し得る。自律的に複製するベクターは、選択された宿主細胞において機能的である複製起点または自立的複製配列（ARS）を有する。しばしば、ベクターは、1つを超える宿主細胞（例えば、クローニングおよび構築についてE. coliおよび発現について哺乳動物細胞）において有用であることが所望される。

【0024】

本明細書において使用される用語「カプセル化」とは、カプセル化の量について議論する場合、ピコグリーン/デキストラン結合アッセイにおいてピコグリーン結合に利用可能ではないか、またはヌクレアーゼアッセイにおいてヌクレアーゼ耐性である凝縮剤-核酸複合体の量をいう。

【0025】

（B. 概論）

凝縮剤-核酸複合体の脂質カプセル化が酵素消化に対するより大きな保護を提供し、そしてカプセル化されていない凝縮剤-核酸複合体よりも高い遺伝子発現を一貫して与えることが今回発見された。それ自体、一つの局面において、本発明は、(a) 脂質、および(b) カプセル化された凝縮剤-核酸複合体を含むリボソームに関する。特定の好ましい実施態様において、そのリボソームは、さらに、(c) 二重層安定化成分を含む。この二重層安定化成分は、そのリボソームと可逆的に会合され得る。

【0026】

本発明のリボソームにおいて使用される凝縮剤は、核酸を複合体化し、そして緻密にする能力を有する任意の化合物であり得る。この複合体は、一般に、少なくとも1つの負に荷電した核酸および少なくとも1つの正に荷電したポリマーを含み、その核酸とそのカチオン性ポリマーとの間の会合は、天然において静電性である。

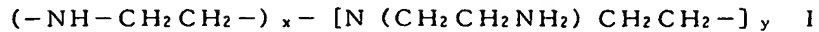
【0027】

それ自体、本発明における使用に適した凝縮剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：ポリカチオン性ポリマー（例えば、ポリエチレンジアミン、ポリリジン、ポリアルギニンおよびポリオルニチン）。核酸に対して親和性を有し、そして本発明における使用に適切な他の凝縮剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：ポリカチオン性の天然のDNA結合タンパク質（例えば、ヒストンおよびプロタミンまたはそれらのアナログもしくはフラグメント）。本発明における使用に適切な他の凝縮剤としては、以下が挙げられる：ポリアミン（これは、以下を含むがそれらに限定されない：スベルミジンおよびスベルミン）、2つ以上の異なる正に荷電したアミノ酸を有するポリカチオンおよび塩基性タンパク質。好ましい実施態様において、凝縮剤は、ポリカチオン性ポリマーである。別の好ましい実施態様において、カチオン性脂質以外の凝縮剤が使用される。当業者は、本発明における使用に適切な他の凝縮剤を認識する。

【0028】

ポリカチオン性ポリマーの特に好ましい例は、ポリエチレンジアミンである。ポリエチレンジアミン（これは、ポリマー性物質であって、ここで、3つ毎の原子が

プロトン化され得るアミノ窒素である)は、以下の一般式を有する：



式Iにおいて、xは、yの値のおよそ2倍である。ポリエチレンイミンは、高度に分岐した物質であって、ここで、一級窒素対二級窒素対三級窒素の比は、およそ1：2：1である。一級窒素は、三級窒素に等しい。なぜなら、各々の分岐点は、鎖末端を有するからである。種々の分子量のポリエチレンイミンが使用され得る。好ましくは、0.8 kDa～約800 kDaの間の分子量が使用され得る。より好ましくは、約25 kDaの分子量が使用され得る。当業者には、種々の分子量のポリエチレンイミンのポリマーが本発明における使用に適切であることが明らかである。種々の分子量のポリエチレンイミンは、Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, Wisconsin) から市販されている。

【0029】

本発明の核酸は、代表的に、10～100,000のヌクレオチドモノマーを有するヌクレオチドポリマーである。この核酸は、細胞性タンパク質の発現を修復または増強する目的のために、被験体に投与される。さらに、この核酸は、相補的な核酸の存在または非存在に関連する臨床的な診断を提供する目的のために、標識（例えば、放射性標識、蛍光標識または比色標識）を有し得る。したがって、核酸すなわちヌクレオチドのポリマーは、ゲノムDNA、cDNA、mRNAまたは核酸アナログを含むオリゴヌクレオチド（例えば、Steinらによる概説、Science, 261:1004-1011 (1993) および米国特許第5,264,423号および同5,276,019号（これらの開示は、本明細書において参考として援用される）に記載されるアンチセンス誘導体）を含む核酸のポリマーであり得る。なおさらに、その核酸は、転写調節配列および翻訳調節配列（プロモーター配列およびエンハンサー配列を含む）をコードし得る。

【0030】

ヌクレオチドポリマーは、一本鎖のDNAもしくはRNA、または二本鎖のDNAもしくはDNA-RNAハイブリッドであり得る。さらに、化学的に改変さ

れたホスホジエステル結合（例えば、チオホスホジエステル）を有する核酸もまた適切である。二本鎖DNAの例としては、構造遺伝子、制御領域および終結領域を含む遺伝子、および自己複製系（例えば、プラスミドDNA）が挙げられる。好ましい実施態様において、この核酸はプラスミドである。

【0031】

一本鎖核酸としては、アンチセンスのオリゴヌクレオチド（DNAおよびRNAに相補的）、リボザイムならびに三重鎖形成オリゴヌクレオチドおよび改変された化学的骨格を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。これらの改変は、好ましくは、安定な非ホスホジエステル結合（ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホロセレネート結合、またはO-アルキルホスホトリエステル結合を含むがそれらに限定されない）に置換されたヌクレオチド結合のいくつかまたは全てを有する。

【0032】

本発明において使用される核酸はまた、1つ以上の糖部分において、および／またはピリミジンもしくはプリン塩基の1つ以上において改変が作製された核酸を含む。糖改変（修飾）の例としては、ハロゲン、アルキル基、アミン、アミド基での1つ以上のヒドロキシル基の置換またはエーテルもしくはエステルとしての官能化が挙げられる。さらに、糖全体は、立体的および電気的に類似する構造（アザ糖および炭素環式糖アナログを含む）で置換され得る。プリンまたはピリミジンの塩基部分における改変としては、例えば、アルキル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンもしくはピリミジン、または当業者に公知の他の複素環式置換基が挙げられる。

【0033】

複数の遺伝子配列もまた、本方法において使用され得る。従って、異なるタンパク質についての配列は、1つの鎖またはプラスミドにおいて配置され得る。プロモーター、エンハンサー、ストレス調節されるプロモーターまたは化学的に調節されるプロモーター、抗生物質感受性領域または栄養感受性領域、ならびに治療タンパク質コード配列が必要に応じて含められ得る。非コード配列もまた、それらが適切な発現を達成するに必要である程度に存在し得る。

【0034】

本方法において使用される核酸は、天然の供給源から単離され得るか、ATC CもしくはGenBankのライブラリーのような供給源から入手され得るか、合成方法によって調製され得る。合成核酸は、種々の溶液または固相方法によって調製され得る。一般に、固相合成が好ましい。亜リン酸トリエステル、ホスホトリエステルおよびHホスホネート化学のような核酸の固相合成のための手順の詳細な説明が広汎に入手可能である。例えば、Itakura、米国特許第4,401,796号；Caruthersら、米国特許第4,458,066号および同第4,500,707号；Beaucageら、Tetrahedron Lett.、22:1859-1862(1981)；Matteucciら、J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191(1981)；Caruthersら、Genetic Engineering 4:1-17(1982)；Jones、第2章、Atkinsonら、第3章およびSproutら、第4章、Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach、Gait(編)、IRL Press、Washington, D. C. (1984)；Froehlerら、Tetrahedron Lett. 27:469-472(1986)；Froehlerら、Nucleic Acids Res. 14:5399-5407(1986)；Sinhaら、Tetrahedron Lett. 24:5843-5846(1983)；ならびにSinhaら、Nucl. Acids Res.、12:4539-4557(1984)を参照のこと（これらは、本明細書において参考として援用される）。

【0035】

さらに、本発明の核酸は、以下のうちから選択され得る：

(a) 遺伝子マーカー（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、 β ガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、抗生物質に（例えば、ハイグロマイシンまたはネオマイシン）に対する耐性を付与する遺伝子）；

(b) 以下のような治療目的のための遺伝子：以下をコードする遺伝子：低密

度リポタンパク質レセプター（高コレステロール血症の症例における欠損（肝臓））、凝固因子（第V因子および第IX因子）、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（フェニルケトン尿症）、アデノシンデアミナーゼ（ADA免疫不全）、リソソーム酵素（例えば、ゴーシェ病の症例における β グルコシダーゼ、ジストロフィンおよびミニジストロフィン（minidistipine）（ミオパシー））、チロシンヒドロキシラーゼ（パーキンソン病）、ニューロン成長因子（アルツハイマー病）、CFTR嚢胞性線維症貫通伝達調節因子（ Δ コピシドーシス）、 α 1アンチトリプシン、核因子（NF- κ B、C/EB β ）、サイトカインおよびインターロイキン、TNF（腫瘍壊死因子）、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ、NOシンターゼ、アンジオテンシンIIレセプター、腫瘍の遺伝子サプレッサー（例えば、p53タンパク質についての遺伝子）、MHCタンパク質（腫瘍組織適合系、特にHLA-B7）、抗発ガン遺伝子（p53、RB、シトシンデアミナーゼ（cytosine desaminase））、センスRNAおよびアンチセンスRNA）；ならびに

（c）ワクチン目的のための遺伝子：ウイルス抗原をコードする遺伝子（例えば、インフルエンザウイルスの核タンパク質）

本発明における使用のための他の適切な核酸は、当業者に容易に明白である。

【0036】

（C. 凝縮剤-核酸複合剤の調製）

ポリカチオンによる核酸凝縮は、その凝縮媒体に存在する全てのイオンの性質および濃度の関数である。従って、その複合体化は、その複合体化媒体のpH、容量、および塩濃度に依存する。負に荷電した核酸を有するカチオン性ポリマー凝縮は、調節され得、そして高塩濃度で阻害さえもされ得る共同のプロセスである。

【0037】

さらに、以前に、O. Boussifら、Proc.Natl.Acad.Sci.92:7297-7301（1995）（本明細書において参考として援用される）において、カチオン性ポリマーであるポリエチレンイミンについて、試薬を添加する順序は、得られる粒子の特性に影響を与えることが記された。例え

ば、PEI溶液を核酸（例えば、DNA）の溶液に滴下して加えることは、PEIに核酸を加えることよりも10倍より効率的であった。

【0038】

以下の方法は、PEIを例として用いるストックカチオン性ポリマー溶液の調製を例示する。カチオン性ポリマー（例えば、PEI）を、脱イオン水に溶解し、そして例えば、HClでpH7.4に中和する。次いで、中和された溶液を、約0.2 μ mの孔サイズを有するMilliporeフィルターを用いて濾過する。PEI/核酸複合体をリボソーム中でカプセル化するために（本明細書において以下に記載する）粒子が均一で小さなサイズが重要である。大きく、そして異質な凝集体は、高すぎる核酸の濃度または水以外の溶液のいずれかを用いたPEIおよび核酸の複合体化の結果である。

【0039】

凝縮剤-核酸複合体について重要な基準は、電荷の比の計算である。一つの実施態様において、凝縮剤-核酸複合体は、正味で正の電荷を有している。凝縮剤-核酸の電荷の比は約10:1から約2:1が好ましく、そして約7:1から約4:1がより好ましい。本発明のPEI-核酸複合体について、325ダルトンの、負の電荷比あたりの平均質量がプラスミドDNAに使用される。PEIについての正の荷電あたりの質量は、258ダルトンであると算出された。これは、6つのPEI窒素のうち1つが生理条件下でプロトン化されており、そしてPEIにおける-CH₂CH₂NH-反復窒素単位あたりの平均質量は43であることを仮定する。

【0040】

別の実施態様において、凝縮剤-核酸複合体は中性である。この実施態様において、凝縮剤の正の荷電は、その核酸の負の荷電に等価である。これは、中性の複合体を生じる。

【0041】

従って、別の実施態様において、本発明は、核酸と凝縮剤とを凝縮して約30nmから約60nmの間の代表的なサイズを有する均一な複合体を与える方法に関する。代表的なカチオン性ポリマーとしてPEIを用いて、この方法は、まず

、PEI溶液(250mL水中に10 μ gのストックPEI)を核酸溶液(100 μ g/250mL)に、ボルテックスしながら滴下して加えることによってその核酸を予備凝縮させる工程を包含する。第二に、予備凝縮した核酸を過剰のPEIを用いて飽和させる。次に、PEI/核酸複合体を、透析により濃縮する。最後に、濃縮されたPEI核酸複合体を一晩、HBS緩衝液に対して透析して、塩濃度を150mMに調整する。最後の工程において、他の緩衝液が使用され得る。これらの緩衝液としては、PBS、スクロース、水または有機溶媒(エタノール中、ここで、エタノールは60-70%を超えない)が挙げられるが、それらに限定されない。

【0042】

複合体におけるポリエチレンジイミン：核酸の比は、約10:1wt/wtから約1.5:1wt/wt、好ましくは約6:1wt/wtから約1.5:1wt/wt、そしてより好ましくは、約4:1wt/wtである。

【0043】

このポリカチオン性ポリマーに対する凝縮された核酸の量を定量することも可能である。例えば、4:1のPEI：核酸のwt/wt比において、その複合体は強固に凝縮するが、ピコグリーンのような核酸定量プローブに対しては容易に接近可能ではない。その核酸が遊離しており、そしてその凝縮剤に対して複合体化されていない場合は、ピコグリーンは、その核酸に結合し、そしてその蛍光がその核酸の定量を可能にする。その核酸を遊離させるために、その複合体を、ポリアニオン性ポリマー(例えば、デキストラン硫酸)で処理する。ヘパリン、またはヘパラン硫酸(これは、その複合体を、その凝縮状態から「開放し」または弛緩させる)もまた使用され得る。この反応は、完了するのに代表的に10~15分かかる。次いで、ピコグリーンを加えて、露出した核酸を定量する。核酸標準曲線を0.2 μ g~1 μ gの範囲で設定する(図4を参照のこと)。各点において、標準量のデキストラン硫酸を添加する。この添加は、デキストラン硫酸がピコグリーンの蛍光の読み取りに対して有する消光効果をオフセットする。この量は、PEI/核酸サンプルを解離させるために使用されるのと同じ量である。このようにして、ポリカチオン性ポリマーと会合した核酸を、定量し得る(図2

を参照のこと)。図2において、サンプル1および2におけるクリアバーは、ピコグリーン蛍光（すなわちバックグラウンド）を表す。

【0044】

図3は、凝縮したPEI-核酸複合体を放出し、そしてその複合体化された核酸を完全に露出させるために必要とされるデキストラン硫酸の最小量を決定するためのデキストラン硫酸の力価測定を例示する。これは、ピコグリーンアッセイを用いた核酸の正確な定量を可能にする。PEIより少なくとも3倍多いデキストラン硫酸が、DNAをピコグリーンに対して完全に露出させるために必要とされる。これは、約5:1のPEI/核酸についての電荷比を表す。種々のPEI/核酸複合体の電荷比が、異なる量のデキストラン硫酸を必要とする。このようにして、電荷比が算出され得る。

【0045】

(D. 凝縮剤-核酸複合体のカプセル化)

別の実施態様において、本発明は、凝縮剤-核酸複合体をリボソーム中にカプセル化させるための方法に関する。この方法は以下の工程を包含する：核酸溶液中に凝縮剤溶液を添加して、凝縮剤-核酸複合体を形成する工程；およびこの凝縮剤-核酸複合体を脂質懸濁物に添加して、カプセル化された凝縮剤-核酸複合体を形成する工程。好ましい実施態様において、この方法は以下を包含する：

- (a) 核酸溶液中に凝縮剤溶液を混合して予備凝縮した核酸を形成する工程；
- (b) 凝縮剤溶液にこの予備凝縮した核酸を加えて、凝縮剤-核酸複合体を形成する工程；
- (c) この凝縮した核酸複合体を透析して、濃縮された凝縮剤-核酸複合体を形成する工程；
- (d) この濃縮された凝縮剤-核酸複合体を、界面活性剤中の脂質懸濁物へと添加する工程；および
- (e) この脂質懸濁物からその界面活性剤を除去して、そのリボソーム中にカプセル化された凝縮剤-核酸複合体を形成する工程。

【0046】

凝縮剤-核酸複合体のリボソームカプセル化は、酵素消化に対する保護を提供

し、そして他の移入方法より高度な遺伝子発現を一貫して与える。凝縮剤-核酸複合体のトランスフェクション能力を最適化するために、その複合体の全体としての電荷が正である必要がある。不幸にも、大きな正電荷比のため、その複合体は毒性であり、そして循環中でそれほど長くは存続しない。従って、凝縮剤-核酸複合体のリボソーム中のカプセル化は、その複合体の毒性レベルを受容可能な値にまで下げ得ることが今回発見された。

【0047】

種々の脂質は、本発明のリボソームにおいて使用され得る。好ましくは、非カチオン性脂質が使用される。そのような脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、セラミドおよびそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。これらとしては、例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ジオレオイルホスファチジルセリン(DOPS)およびそれらの混合物が挙げられる。本発明における使用に適切な好ましいアニオン性脂質の他の例としては、カルジオリピン、ジアシルホスファチジン酸、N-スクシニル-ホスファチジルエタノールアミン(N-スクシニル-PE)、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリエチレングリコール、およびそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。

【0048】

ホスファチジルエタノールアミンおよび飽和脂肪酸もしくは不飽和脂肪酸(約C₆~C₂₄の範囲の炭素鎖長を有する)を含むホスファチジルセリンが好ましい。約C₁₄~C₂₀の範囲の炭素鎖長を有する脂肪酸が特に好ましい。ホスファチジルエタノールアミン(モノ不飽和脂肪酸またはジ不飽和脂肪酸ならびに飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸の混合物を有する)もまた使用され得る。適切なホスファチジルエタノールアミンとしては、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)およびジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)が挙げられるがそれらに限定されない。ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンが好ましいホスファ

チジェルエタノールアミンである。好ましいホスファチジルセリンは、ジオレオ
イルホスファチジルセリンである。

【0049】

本発明における使用に適切なセラミドは、多数の供給源から市販されている。
さらに、セラミドは、例えば、卵または脳から、周知の単離技術を用いて単離さ
れ得るか、あるいは、それらは、米国特許第5,820,873号(1998年
10月13日発行)その(教示は、本明細書において参考として援用される)に
開示される方法および技術を用いて合成され得る。上記出願において恣意召され
た合成経路を用いて、 $C_6 \sim C_{24}$ の範囲の炭素鎖長を有する飽和脂肪酸または不
飽和脂肪酸を有するセラミドが調製され得る。好ましいセラミドは、約 C_{14} から
約 C_{20} のアシル鎖長を有する。

【0050】

種々の鎖長および飽和の程度の種々のアシル鎖基を有するホスファチジルエタ
ノールアミンを、ポリエチレングリコールと結合体化して二重層安定化成分を形
成し得る。そのようなホスファチジルエタノールアミンは、市販されているか、
または当業者に公知の従来の技術を用いて単離もしくは合成され得る。

【0051】

種々の鎖長および飽和の程度を有する種々のアシル鎖基を有するセラミドを、
ポリエチレングリコールと結合させて、二重層安定化成分を形成し得る。ホスフ
ァチジルエタノールアミンとは対照的に、セラミドが、その鎖長および飽和の程
度に関して、容易に変更され得る唯一のアシル基を有することは、当業者に明白
である。

【0052】

さらに、このリボソームは、二重層安定化成分を含む。適切な二重層安定化成
分の例としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：脂質、脂質誘導体
、界面活性剤、ポリエチレングリコール(PEG)、タンパク質、ペプチド、ポ
リアミド、オリゴマー(例えば、ATTA)およびpH感受性オリゴマー(例え
ば、PEAA)(米国特許出願番号第08/996,783号(1997年12
月23日出願)、同第60/073,852号(1998年2月2日出願)およ

び同第60/083, 294号(1998年4月28日出願)を参照のこと)(これらの教示は、本明細書において参考として援用される)。現在好ましい実施態様において、二重層安定化成分は、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルセリンに結合体化された(すなわち結合された)ポリエチレングリコールである。同様に好ましい実施態様において、二重層安定化成分は、セラミドに結合体化されたポリエチレングリコールである。ポリエチレングリコールは、当業者に公知であり、そして使用される、標準的な結合反応を用いて、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジエルセリン、あるいは、セラミドと結合体化され得る。さらに、予備形成されたポリエチレングリコールホスファチジルエタノールアミン結合体が、Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama)から市販されている。

【0053】

種々の分子量のポリエチレングリコールを使用して、本発明の二重層安定化成分を形成し得る。種々の分子量のポリエチレングリコールは、多数の異なる供給源から市販されているか、あるいは、それらは、当業者に周知の標準的な重合技術を用いて合成され得る。現在好ましい実施態様において、ポリエチレングリコールは、約550～約8500ダルトンの範囲の分子量を有し、そしてさらにより好ましくは、約2000～約5000ダルトンである。一般に、ポリエチレングリコールの分子量を増やすと、安定化を達成するのに必要な二重層安定化成分の濃度は減少することが見出されている。

【0054】

上記に加えて、ポリアミドオリゴマー(例えば、ATTA)、pH感受性オリゴマー(例えば、PEAA)、界面活性剤、タンパク質およびペプチドは、二重層安定化成分として使用され得る。二重層安定化成分として使用され得る界面活性剤としては、以下挙げられるがそれらに限定されない:Triton X-100、デオキシコーレート、オクチルグルコシドおよびリゾホスファチジルコリン。二重層安定化成分として使用され得るタンパク質としては、グリコホリンおよびシトクロームオキシダーゼが挙げられるがそれらに限定されない。タンパク質の切断(内因性プロテアーゼによる)(これは、二重層の外側のバルクなドメ

インの欠失を生じる)は、そのタンパク質の二重層安定化能力を減少させることが予想される。さらに、二重層安定化成分として使用され得るペプチドとしては、例えば、ペンタデカペプチド、アラニン- (アミノ酪酸-アラニン)₁₄が挙げられるがそれらに限定されない。このペプチドは、例えば、ポリエチレングリコールと結合され得、これは、二重層から外へのその移動を促進する。あるいは、カルジオトキシンおよびメリチンのようなペプチド(これらは、両方とも、二重層における非ラメラ相を誘発することが公知である)は、PEGに結合され得、そしてそれによって、二重層安定化剤に変換され得る。

【0055】

代表的に、二重層安定化成分は、約0.05モル%~約50モル%の範囲の濃度で存在する。現在好ましい実施態様において、二重層安定化成分は、0.05モル%~約25モル%の範囲の濃度で存在する。さらにより好ましい実施態様において、二重層安定化成分は、5モル%~約15モル%の範囲の濃度で存在する。当業者は、二重層安定化成分の濃度が、使用される二重層安定化成分に依存して変動し得ることを理解する。

【0056】

本発明の複合体をカプセル化する一つの方法は、界面活性剤透析を用いることによる。代表的に、この複合体のカプセル化は、この脂質を溶媒に溶解すること、次いで、その溶液を窒素流の下で乾燥する工程によって達成される。好ましくは、この脂質は、非カチオン性脂質である。より好ましくは、この脂質は、DOPE、DOPS、PEG-セラミドおよびそれらの混合物である。脂質の核酸に対する比率は、約5:1wt/wt~約100:1wt/wt、好ましくは約10:1wt/wt~約50:1wt/wtである。所望される、最終的な脂質濃度の合計は、約10mg/mLである。薄い脂質膜は、乾燥手順において混合工程(例えば、ボルテックスすること)を包含することによって達成される。任意の残りの溶媒は、凍結乾燥によって除去される。

【0057】

次いで、この脂質膜を界面活性剤に溶解するか、あるいは、エタノール中に溶解する。次いで、凝縮剤-核酸複合体(例えば、約50μg/mL~約1000

$\mu\text{g}/\text{mL}$ の核酸濃度を有するPEI/核酸複合体)を加える。約 $400\mu\text{g}/\text{mL}$ の核酸濃度が好ましい。次いで、得られた混合物を、それが明澄になるまでボルテックスし、次いで透析する。この手順は、凝縮剤-核酸複合体をカプセル化するリボソームを生じる。この方法を、より大きな調製物における使用のために、比例的に規模拡大し得る。

【0058】

本発明における凝縮剤-核酸複合体をカプセル化するために有用な界面活性剤は、代表的に、1つ以上の中性界面活性剤、または界面活性剤と有機溶媒との組合せである。界面活性剤は、好ましくは、N, N' - ((オクタノイルイミノ) - ビス - (トリメチレン)) - ビス - (D - グルコンアミド) (BIGCHAP) ; BRIJ 35 ; デオキシ - BIGCHAP ; ドデシルポリ (エチレングリコール) エーテル ; Tween 20 ; Tween 40 ; Tween 60 ; Tween 80 ; Tween 85 ; Triton X-405 ; ヘキシル - β - D - グルコピラノシド、ヘプチル - β - D - グルコピラノシド、オクチル - β - D - グルコピラノシド、およびノニル - β - D - グルコピラノシドであり ; ここで、オクチル - β - D - グルコピラノシドが最も好ましい。

【0059】

界面活性剤との組み合わせで有用である有機溶媒としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない : クロロホルム、ジクロロメタン、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、シクロペンタン、ベンゼン、トルエン、アセトン、ベンジルアルコール、メタノール、または他の脂肪族アルコール (例えば、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、tert - ブタノール、イソブタノール、ペンタノールおよびヘキサノール。有機溶媒の選択は、代表的に、溶媒極性およびその溶媒がカプセル化のより後の段階において除去され得ることについての容易さの考慮を包含する。従って、界面活性剤とともに用いられる好ましい有機溶媒は、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、メタノールおよびジエチルエーテルであり、ここで、クロロホルムおよびメタノールが最も好ましい。

【0060】

非カチオン性脂質、二重層安定化成分および界面活性剤の溶液は、水溶液であ

る。凝縮剤-核酸複合体と、非カチオン性脂質および界面活性剤の溶液との接触は、代表的には、核酸の第一の溶液と、その脂質および界面活性剤の第二の溶液とを一緒に混合することによって達成される。当業者は、この混合することが、多数の方法（例えば、ボルテックスミキサーを用いるような機械的手段による）によって行われ得ることを理解する。好ましくは、この核酸溶液はまた、界面活性剤溶液である。

【0061】

代替的な実施態様において、脱水-再水和方法を使用して、凝縮剤-核酸複合体をカプセル化し得る。この方法において、溶媒における脂質混合物を乾燥し、次いで、その凝縮剤-核酸複合体を含む緩衝液中で再水和する。このリボソームの押し出しがこの再水和工程に続く。脱水-再水和方法は、上記の界面活性剤透析技術よりも低いカプセル化効率を生じる。

【0062】

さらに別の実施態様において、逆相エバポレーション方法を使用してこの複合体をカプセル化し得る。この方法において、この脂質は、溶媒系または混合された溶媒系中にまず溶解される。凝縮剤-核酸複合体を、水に溶解し、次いで脂質混合物に添加する。この溶媒系を、単一の相が観察されるまで添加する。過剰の溶媒がエバポレーションによって除去された後、その溶液を押し出して、カプセル化されたりボソームを得る。

【0063】

なおさらに別の実施態様において、エタノール注入方法が、その複合体のカプセル化のために使用され得る。この方法において、その脂質を、エタノールまたは別の適切な溶媒に溶解し、そして水中に凝縮剤-核酸複合体を含む管に滴下する。リボソームが直ぐに形成され、そしてそのエタノールを透析除去して、カプセル化されたりボソームを得る。

【0064】

本発明のリボソームのサイズは、約20nm～約200nmの直径である。より好ましくは、本発明のリボソームは、約50nm～約150nmの直径である。特に好ましい実施態様において、本発明のリボソームは、約70nm～約80

nmの直径である。

【0065】

凝縮剤-核酸複合体およびリボソームのサイズ分布は、それぞれ、固体粒子様式および小胞様式においてNicomp Submicron Particle Sizer (Model 370)を用いた準弾性光散乱によって測定され得る。

【0066】

上記の方法を用いてリボソームのカプセル化効率を測定するために、ピコグリーンおよびデキストラン硫酸を用いる。次いで、カプセル化されていない複合体の量 M_{uncap} (ピコグリーンの蛍光から決定される)をデキストラン硫酸およびピコグリーンの組合せを介して定量し得る。Triton X-100 (これは、リボソームを完全に破壊して分離させる)を添加することによってもまた、存在するDNAの合計 M_{tot} を定量することが可能である。次いで、以下の式を介してカプセル化の程度を算出する：

$$\% \text{カプセル化} = (1 - M_{uncap} / M_{tot}) \times 100$$

カプセル化効率は、図6を参照して最も良好に説明される。図6に示されるように、ピコグリーンをカプセル化されていない複合体に添加する場合、蛍光はバックグラウンドにある。デキストラン硫酸が、カプセル化されていない複合体に添加される場合、蛍光は3.0に増える。Triton X-100を添加して、リボソームを破壊する場合、蛍光のさらなる急増が生じる (サンプル1を参照のこと)。これらのピークの比は、カプセル化の程度を与える。カプセル化されていない複合体を全て除去するために、カチオン交換カラムを使用し得る。

【0067】

本発明の方法を用いるにおいて、約30%~約70%の凝縮剤-核酸複合体をカプセル化することが可能である。好ましくは、%カプセル化は、約40%~約70%であり、そして最も好ましくは%カプセル化は、約50%~約70%である。

【0068】

図7を参照すると、DOPSがカプセル化効率を最適化することについての力

価測定が例示されている。特定の実施態様において、リボソーム中の約8～9mol %のDOPSの濃度が、その複合体（この場合PEI/DNA）の最も良い捕捉を与える。2%を超えるDOPSの濃度のこの点のシフトは、カプセル化効率を劇的に下落させる。

【0069】

（E. リボソーム捕捉された複合体の投与）

リボソーム捕捉された凝縮剤-核酸複合体の形成の後に、このリボソームを使用して、トランスフェクトされるべき細胞とそのリボソームとを接触させることによって細胞をトランスフェクトし得る。リボソーム捕捉された複合体は、ほとんど任意の細胞型に吸着され得る。一旦吸着されると、そのリボソームは、その細胞の一部分によってエンドサイトーシスされ得るか、細胞膜と脂質を交換し得るか、脱安定化され得るか、または細胞と融合され得るかのいずれかである。このリボソームの核酸部分の移入または取り込みは、これらの経路のいずれか1つによって起こり得る。特に、融合が起こる場合、その脂質二重層膜は、細胞膜に組み込まれ、そして二重層の内容物は、細胞内流体と合わさる。このリボソームと原形質膜との融合は、その二重層安定化成分がそのリボソームの外に移動し、そして二重層安定化が喪失もしくは減少する場合に起こる。何らの理論に拘束されないが、ポリカチオン性媒介遺伝子移入は、DNA凝縮および原形質膜のアニオン性残基への生じた複合体の結合を包含すると考えられる。効率的であるためには、その複合体は、正味の正電荷を有すべきである。

【0070】

その細胞とそのリボソーム捕捉された凝縮剤-核酸複合体との間の接触は、インビトロで行われる場合、生物学的に適合する媒体中で行われる。

【0071】

このリボソーム捕捉された複合体を用いたその細胞の処理は、一般に、生理的温度（約37℃）で、約1～48時間の、好ましくは約2～4時間の範囲の期間行われる。インビトロ適用について、核酸の送達は、植物起源であろうと、動物起源であろうと、脊椎動物性であろうと、無脊椎動物性であろうと、およびどの組織または型であろうと、培養物中で増殖する任意の細胞に対してであり得る。

好ましい実施態様において、その細胞は動物細胞であり、より好ましくは哺乳動物細胞であり、そして最も好ましくはヒト細胞である。

【0072】

図9を参照すると、Cos-7細胞が、1:4のw/w比率でPEIと複合体化された1 μ gのカプセル化されたpINEX/L018プラスミドDNAでトランスフェクトされた。用量応答および経時的な分析において、図9は、トランスフェクション活性がDNA用量が増えるにつれて増加したことを示す。最高のトランスフェクション活性は、5 μ gのDNAにおいて観察された。最小のトランスフェクションは、24時間の時点でみられた。このトランスフェクション活性は、72時間の時点まで増加しつづけた。

【0073】

(F. 薬学的調製物)

本発明のリボソーム包括化(entrapped)凝縮剤(condensing agent)-核酸複合体は、単独でまたは生理学的に受容可能なキャリアと共に投与され得る。このようなキャリアには、投与経路および標準的薬学的実施に従って選択される生理学的な生理食塩水またはリン酸緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。

【0074】

リボソーム包括化凝縮剤-核酸複合体を含有する薬学的組成物は、標準的技法に従って調製され、そしてさらに薬学的に受容可能なキャリアを含む。一般的に、通常の生理食塩水が、薬学的に受容可能なキャリアとして利用される。他の適切なキャリアには、例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどが挙げられ、これらは、安定性を高めるための糖蛋白(例えば、アルブミン、リボ蛋白、グロブリンなど)を含む。生理食塩水または他の塩を含有するキャリアを含む組成物において、このキャリアは、好ましくは、リボソーム形成後に添加される。従って、リボソーム包括化複合体が形成された後、このリボソームは、薬学的に受容可能なキャリア(例えば、通常の生理食塩水)中に希釈され得る。これらの組成物は、従来の滅菌技法によって滅菌され得る。得られた水溶液は、使用のために包装され得るか、または無菌条件下で濾過されて凍結乾燥

され得、この凍結乾燥された調製物は、投与の前に滅菌水溶液と混合される。この組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる場合に、例えばpH調製剤および緩衝剤、張度調製剤などのような薬学的に受容可能な補助的物質（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなど）を含有し得る。

【0075】

薬学的処方物中のリボソーム包括化複合体の濃度は、広範囲に（すなわち、約0.05重量%未満、通常は約2～5重量%または少なくとも約2～5重量%から10～30重量%まで）変化し得、そして、選択される投与の特定の形態に従って、主に流体容積、粘性などによって選択される。例えば、上記の濃度は、処置と関連される流体負荷を低くするために増加され得る。診断について、投与されるリボソーム包括化複合体の量は、使用される特定のラベル、診断される疾患状態および医師の判断に依存するが、一般的には、体重1kg当たり約0.01mgと約50mgとの間、好ましくは、体重1kg当たり約0.1と約5mgとの間である。

【0076】

それらの使用の別の例において、リボソーム包括化凝縮剤-核酸複合体は、広範囲の局所的用量形態（ゲル、オイル、エマルジョンなどが挙げられるが、これらに限定されない）へ組み込まれ得る。例えば、リボソーム包括化凝縮剤-核酸複合体を含有する懸濁液が、処方され得、そして局所的クリーム、ペースト、軟膏、ゲル、ローションなどとして投与され得る。

【0077】

本発明はまた、キット形態でリボソーム包括化凝縮剤-核酸複合体を提供する。このキットは、典型的に、このキットの種々の要素を保持するために区画化される容器から構成される。このキットは、投与ための説明書と共に、本発明のリボソームを含む。なお他の実施態様において、リボソーム包括化凝縮剤-核酸複合体は、このリボソームへ結合された標的化部分（targeting moiety）を有する。標的化部分（例えば、抗体、蛋白質）を脂質（例えば、本発明において使用されるもの）へ結合させる方法は、当業者に公知である。

【0078】

リボソーム包括化凝縮-核酸複合体のための用量は、脂質に対する核酸の割合、ならびに年齢、体重、および患者の症状に基づいて投与する医師の見解に依存する。

【0079】

本発明は、特定の実施例によってより詳細に記載される。以下の実施例は、例示目的のみのために提供され、そして本発明をいかなる様式にも限定することを意図しない。

【0080】

(G. 実施例)

(I. 物質)

全ての実験において使用されたレポーター遺伝子プラスミドは、pINEX/L018 (5650bp) であり、これは、ヒトサイトメガロウイルス即時初期型エンハンサー/プロモータの制御下に、ホタルルシフェラーゼをコードする。プラスミドDNAを、E. coli, DH5αからアルカリ溶解、続いて塩化セシウム勾配上の二重バンド形成によって調製した。(例えば、Thierry A. R., J. Liposome Research 7:143-159 (1997) (本明細書中、参考として援用される)を参照のこと。) PEI 25 kDaを、Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) から購入した。エチジウムブロミドピコグリーン (picogreen) をSigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から得た。精製ホタルルシフェラーゼを、Boehringer Mannheim (Germany) から購入した。PEG-セラミド (社内で作製) を除く全ての脂質を、Avanti Lipidから得る。仔ウシ血清を、Intergen (New York, USA) から購入した。全ての培養培地を、Stemcell Technology (Vancouver, BC) から購入した。本研究における他の試薬を、Sigma Chemical Co. から得、そしてさらなる精製なしに使用した。

【0081】

(11. 方法)

(a. PEI/プラスミドDNA複合体の調製のための方法)

1.) PEI溶液 (1.6mg PEI/mL水) : 0.1容量のPEI溶液を、針サイズ26G3/8ゲージを取り付けたシリンジを使用して、ボルテックスしながら、プラスミドDNA溶液 (1mg プラスミドDNA/1.25mL水) へ滴下して加えた。2.) 次いで、工程1において作製した予め凝縮したPEI/DNAを、針サイズ26G3/8ゲージを取り付けたシリンジを使用して、ボルテックスしながら、PEI溶液 (500mLの水へ希釈した390gのストックPEI) へ滴下して加えた、PEI/プラスミドDNA複合体を形成した。このPEI/DNA複合体の得られた表面電荷は、正味の正電荷である。3.) PEI/プラスミドDNA複合体を、次いで、透析バック (6000~8000分子量カットオフ、Spectra-Por、Spectrum) へ移し、そして乾燥剤 (ポリエチレングリコール (分子量10,000)) で覆った。4.) この凝縮したPEI/プラスミドDNA複合体を、一晩、HBS (150mM NaCl、5mM~25mM HEPES)、pH7.45に対して透析し、NaCl濃度を150mMへ調整した。

【0082】

(ii. プラスミドDNA定量のための方法)

上記のPEI/プラスミドDNA複合体を、水中のポリアニオンポリマー (例えば硫酸デキストラン) で処理し (ヘパリン硫酸またはヘパラン硫酸などの他のポリマーもまた使用され得る)、ここで、各4 μ gのPEIについて、40 μ gの硫酸デキストランを使用する。この反応は、典型的に、10~15分の間に起こり、完了する。次いで、4 μ lピコグリーンを、このPEI/プラスミドDNA複合体へ添加する。DNA標準曲線を、0.2 μ g~1.0 μ gの間にわたる範囲で設定し、ここで、各ポイントで、硫酸デキストランの標準化量を添加する。このことは、このピコグリーンの蛍光読み取りに対する硫酸デキストランの消光効果を補正することになる。この量はまた、PEI/プラスミドDNAサンプルを解離するために使用される量と同量でなければならない。

【0083】

(iii. 脂質においてPEI/プラスミドDNA複合体をカプセル化するためのプロトコル)

クロロホルムに溶解させた脂質、DOPE (82モル%)、DOPS (8モル%) およびPeg-Ceramide (C20) (10モル%) を、まず、窒素流下で乾燥させた。所望される最終的な総脂質濃度は、10mg/mLである。薄い脂質膜を、乾燥手順においてボルテックスすることまたはする工程を含むことによって達成する。残存する溶媒を、一晩さらなる凍結乾燥をすることによって除去した。この乾燥した脂質膜を、次いで、凍結乾燥器から除去し、そして200 μ lのOGP (200mM) を添加した。激しくボルテックスし、続いて断続的に65℃で5分間加熱して、この洗剤へこの脂質を溶解させた。見かけ上未溶解の脂質が見られ得なくなると、DNA濃度が400 μ g/mLであるPEI/DNA複合体を、次いで、この脂質懸濁液に添加する。使用したこの脂質：DNA w/w割合は、それぞれ10mg : 400 μ gである。500 μ g/mLの濃度より上のいずれものDNAが、沈殿または凝結を生じさせることが見出された(最終生成物は、攪拌の際にすぐに消滅する大きな粒子を有する)。次いで、得られた混合物を、透明になるまでボルテックスし、次いで、透析のためにSpectra-Por透析バックへ移した。この透析緩衝液を、5mM HEPES、150mM NaClから作製し、そして適切な量のNaOHで滴定し、約7.45のpHを達成する。次いで、この混合物を、24時間透析し、4時間ごとに緩衝剤を交換する。

[0084]

(iv. 脂質処方物のカプセル化効率を測定するための方法)

脂質粒子のカプセル化効率を測定するために、ピコグリーンおよび硫酸デキストランを使用した。非カプセル化複合体の量 M_{uncap} (ピコグリーンの蛍光から測定される) は、硫酸デキストランおよびピコグリーンの組み合わせによって定量され得た。Triton X-100 (これは、この脂質粒子を完全に解離させる) を添加した場合、存在する総DNA、 M_{tot} を測定し得た。カプセル化の程度を、次いで、以下の式を使用して計算する：

$$\% \text{カプセル化} = (1 - M_{uncap} / M_{tot}) \times 100.$$

【0085】

(v. カプセル化PEI/プラスミドDNA脂質粒子を処理するためのプロトコル)

カチオンゲル約100mL (Dowex-50W、カタログ番号50X8~400、Sigma)を、まず、約500mLの0.5M HClを含有する容積測定フラスコ(1000mL容量)に配置し、これは、プロトンリザーバとして機能する。マグネチック攪拌棒を、このフラスコ内へ含ませ、そしてこの混合物を、攪拌プレート上でゆっくりと一晩攪拌した。翌日、このゲルを、次いで、クロマトグラフィーカラム(Glass Econo-カラム、カタログ番号737~1012、BioRad)へ高さ約5cmまで充填する。このゲルを、次いで、10容量の蒸留水で洗浄し、このゲルのpHを正規化する。洗浄後、100mLの5M NaClを使用してこのゲルに残存する不純物を洗浄する。最終的に、10カラム容量の150mM NaCl HBSを使用して、このカラムを平衡化する。

【0086】

(v. インビトロでいくつかの細胞株を使用してPEI/プラスミドDNA脂質粒子をトランスフェクションするための方法)

Lewis Lung、SK-OV-3、LS180、Cos7、B16およびU87細胞を、24ウェルプレート(Falcon3047)に、10%仔ウシ血清を含む1mLの培地中、1ウェル当たり 4×10^4 、 2×10^4 、 4×10^4 、 2×10^4 、 4×10^4 および 4×10^4 細胞の密度で、播種した。B16およびLS180細胞を、MEM+Earle's Saltsで増殖させ、Lewis Lung、Cos7およびU87細胞を、高グルコースを含むDMEM中で増殖させ、そしてSK-OV-3細胞を、RPMI 1640培地で増殖させた。細胞を、一晩、トランスフェクション時に70~80%コンフルエントまでインキュベートした。このカプセル化PEI凝縮DNA脂質処方物を、上述のように調製し、そして3連で適切なウェルへ添加した。これらのプレートを短時間攪拌し、次いで、37℃(5%CO₂)で遺伝子発現についてアッセイする前に24時間および48時間インキュベートした。

【0087】

ルシフェラーゼ遺伝子発現を、96ウェルプレート（カタログ番号011-010-7411、Dynatech）を使用するルミノメーター（Dynatech Microlite™ ML3000 Microtiter）で測定した。細胞を、PBS緩衝液で1度リンスし、次いで、150mLの溶解緩衝液（0.1% Triton X-100、250mリン酸ナトリウム緩衝液、pH8.0）を用いて室温で10～15分間溶解させた。10 μ lの細胞溶解産物についての2連のアッセイを実施した。標準曲線を、偽トランスフェクションした細胞溶解産物へ希釈した精製したルシフェラーゼタンパク質を使用して作成した。

【0088】

（vi. インビトロでトランスフェクトしたサンプルの各々の総蛋白質を測定するための方法）

蛋白質アッセイを、ビスニコニン酸（bicinchoninic acid）（BCA）比色方法を使用して実施した。このアッセイにおいて、10 μ lの溶解産物を、96ウェルプレート（カタログ番号011-010-7411、Dynatech）の個々のウェルへ移し、200 μ lのMicro BCA 作用試薬を各ウェルへ添加し、混合し、そして37℃で2時間インキュベートした。各々のウェルにおけるこの蛋白質の量を、同一プレート上の1系列の2連のウェルへ添加したBSA蛋白質標準物（1～16 μ g/ウェル）との比較によって決定した。サンプルおよびBSA蛋白質標準物を有するプレートを、色を発色させた後、マイクロタイタープレートリーダー（Dynatech MR5000）において、570nmで読み取った。

【0089】

（vii. インビトロ毒性のレベルを評価する方法）

0.1%クリスタルバイオレット試薬を0.05%へ、20%エタノールで希釈する。プレートを1500rpmで10分間遠心分離する。緩衝液をピペットチップボックスのふたへPBS緩衝液を注ぎそしてこれらのプレートを浸すことによって、プレートを2回、この緩衝液でリンスする。プレート間のPBS緩衝

液を交換する。ペーパータオルの束上にプレート反転させ、そしてバットを徐々に乾燥させる。50～100 μ lの0.05%クリスタルバイオレットを、各々のウェルへ添加する。プレートを室温で10分間インキュベートする。プレートを、PBS洗浄について上述したように、水道水でリンスする。プレートをベントップで一晩乾燥させる。100 μ lの100%メタノールを、各々のウェルへ添加する。メタノール添加の5分以内にプレートを、プレートリーダーを使用して、570 nmで読む。

【0090】

Cos-7細胞を、96ウェルプレートへ、200 μ lの完全培地中、 2.5×10^3 の密度で播種し、そして72時間、90%コンフルエンスまでインキュベートした。異なる量のカプセル化PEI凝縮DNA処方物およびPEI/DNA複合体を、3連で適切なウェルへ添加した。24時間インキュベートした後、クリスタルバイオレットでこれらの細胞を染色した。

【0091】

(viii. インビボ系においてPEI/プラスミドDNA脂質粒子を送達するための方法)

雌性C57マウスに、 1×10^5 のB16腫瘍細胞を腹腔内に(i.p.)注射した。B16腫瘍増殖の7日目、75gのルシフェラーゼプラスミドのDNA用量/処方物(カプセル化PEI/DNA脂質粒子)を、腹腔内注射によって500 μ lの容量で投与した。コントロール動物に、等容量の生理食塩水を注射した。腫瘍を、異なる時点で収集し、液体窒素で急速凍結させ、そして分析まで-70℃で保存した。個々の腫瘍を、小さなビーズ(small bead)(カタログ番号6520-401/404、Bio 101)を充填したFastPrepホモジナイザー(Bio 101 inc.)を使用して5の速度設定で5秒間ホモジナイズし、次いで、第2のビーズ、および1mg/mL BSA(カタログ番号A-2153、Sigma)で補充した一定量の1×CCLR試薬(Cell Culture Lysis Reagent カatalog番号E1531、Promega)を、各チューブに添加した。このホモジナイズを、FastPrep装置(Fast Prep™ FP120 Instrumen

t、Bio 101) 中で、5の速度設定で6秒間2回実施した。このホモジネートを、新しいEppendorfチューブへ移し、そして大きな組織片を、短時間の遠心分離によって、試験管の底にペレット化した。20 μ lのホモジネートおよび20 μ lのコントロール組織ホモジネートで希釈した標準ルシフェラーゼタンパク質を、2連でアッセイした。結果を、1器官または腫瘍1グラム当たりのルシフェラーゼタンパク質のpgへ変換した。

【0092】

(ix. 血清におけるアミノトランスフェラーゼ (AST/GOT) 活性のレベルを測定することによって、インビボ系における毒性を評価するための方法)

1.) 10mLの脱イオン水をバイアルへ添加する。反転によって(攪拌しない) 数回迅速に混合する。試薬を16時間まで室温でまたは7日間まで冷蔵で保存する。2.) 分析前に少なくとも1/2時間UVランプをつける。kinetics分析へ進み、そしてこのkinetics設定内のデフォルトプログラムを使用する。分光光度計を340nmへ、そして時間を30、60、90、および120秒として設定する。水でブランク(blank)をとる。3.) 500 μ lの試薬を、キュベットへ添加する(この試薬が25℃であることを確認すること)。4.) 50 μ lの試験血清を添加し、そしてピペティングを上げ下げすることによって混合する。5.) 60秒後にこの吸光度を読む。これは、初期値(inA)である。6.) inAを読んだ30秒後にこの吸光度を読む。これは、線形反応を確認するために使用される。7.) inAを読んだ60秒後にこの吸光度を読む。これは、最終読み値(finA)である。8.) 初期Aから最終Aを減算することによって1分当たりの(Aを計算する。1分当たりの(Aが0.280よりも大きい場合、1部のサンプルを1部の等張生理食塩水で希釈し、そして再度アッセイする。結果に2を掛けて、この希釈を補正する。9.) 以下を計算する:

AST (U/L)

= 1分当たりの(A \times TV \times 1000

6.22 \times LP \times SV

TV = 総容積 (0.55 mL)

SV = サンプル容積 (0.05 mL)

6.22 = 340 nmでのNADHのミリモル濃度吸光係数

LP = 光路 (1.0)

1000 = mL当たりの単位からリットル当たりの単位への変換

= 1分当たりの $(A \times 0.55 \times 1000)$

$6.22 \times 1.0 \times 0.05$

= 1分当たりの $(A \times 1786 (\times 1.37 < \text{値を} 25^\circ\text{Cで測定した場合}>))$

活性の1単位は、酵素の量として定義し、これは、このアッセイ手順の条件下で1分当たり1モルのNADを生成する。

【0093】

(実施例1)

この実施例は、PEI/DNA複合体への硫酸デキストランの効果を例示する。

【0094】

図2 (サンプル1) は、ピコグリーンを、PEI/DNA複合体を含有するリボソーム処方物のサンプルへ添加した場合、蛍光読み値が、バックグラウンドで十分であることを示す。DNAが凝縮剤PEIによって十分に保護されることが、明らかである。硫酸デキストランを添加すると、蛍光において顕著なジャンプが生じる。DNAは、同一の凝縮形態では明らかになく、従って、ピコグリーンへのアクセスが可能となる。サンプル2において、Triton X100を添加すると、蛍光読み値において顕著な変化はなく、すなわちバックグラウンドと類似である。このことは、Tritonは、いかなる顕著な様式でも、これらの複合体に影響を与えないという示唆である。硫酸デキストランを添加すると、蛍光が増加する。

【0095】

(実施例2)

この実施例は、硫酸デキストランの使用および複合体解離のために必要とされるその量を例示する。

【0096】

図3に例示されるように、添加される硫酸デキストランの量を増加させると、蛍光もまた増加する。このことは、より多くのDNAがピコグリーンへアクセス可能にされることを示す。蛍光における増加は、最終的にいくらかのレベルで次第に消滅し、そして最終的に、蛍光シグナルは、過剰の硫酸デキストランによって消光される。最適な硫酸デキストランとPEIとのw/w割合は、およそ6:1である。図3における各点は、約15分のインキュベーション期間を含むことに注意する。

【0097】

(実施例3)

この実施例は、PEI-DNA複合体の緩和時間を例示する。

【0098】

図5は、硫酸デキストランの効果下でのPEI/DNA複合体の時間緩和プロフィールを例示する。このグラフは、明確に、これらの複合体の緩和が瞬間事象でないことを示す。ピコグリーン蛍光シグナルによって示されるように、初期緩和は迅速であり、最終的には最終平衡へ遅くなる。これらの結果は、定量目的のために、硫酸デキストランの要求量が、サンプルより前に添加され、そして緩和プロセスが完了したことを確実にするために少なくとも15分間インキュベートさせなければならないことを示す。

【0099】

(実施例4)

この実施例は、PEI/DNA複合体のリボソームへのカプセル化効率を例示する。

【0100】

図7において示されるように、カプセル化効率を最適化するために、DOPSを滴定し、そして8~9モル%の間のDOPSが約55%での最善のカプセル化を与えることが見出された。このパーセントカプセル化を、カラム充填の前に測定した。カプセル化効率はこの濃度未満で急激に降下し、このことは、負の表面電荷密度における手順の高感度を示す。これを150mM NaCl濃度での緩衝液中で得たことを記す。NaCl濃度を変化させることは、カプセル化を最適

化するために必要とされるDOPSの量を変化させる。インビトロ試験について、約8モル%のDOPSが最適であった。

【0101】

(実施例5)

この実施例は、PEI/DNA複合体のインビトロでのトランスフェクションの効率を例示する。

【0102】

図9において示されるように、Cos-7細胞を、4:1w/wの割合でPEIで複合体化した、1 μ gのカプセル化pINEX/L018プラスミドDNAを用いて、トランスフェクトした。この実験において、用量応答および時間経過を分析した。図9は、DNA用量が増加する場合に活性が増加することを示す。最高のトランスフェクション活性を、5 μ gのDNAで観察した。最小のトランスフェクションは、24時間時点で見られた。このトランスフェクション活性は、72時間時点まで増加し続けた。

【0103】

(実施例6)

この実施例は、カプセル化PEI/DNA複合体の毒性の減少を示す。

【0104】

図10に示されるように、5.3での複合体電荷割合を有する用量応答を伴うカプセル化PEI/DNA複合体の毒性研究を実施した。例示として、選択した時点は、48時間であった。コントロールは、成分を添加していない細胞株である。このグラフは、明確に、非カプセル化複合体が、1 μ g用量で始まる顕著な毒性を示すことを表す。これらのカプセル化複合体は、2 μ g DNAまで相対的な毒性を示さなかった。

【0105】

図11において示されるように、(1)カチオン交換カラムによって処理されていないリボソームと(2)そのように処理されているリボソームとの間の毒性の比較が例示される。非カプセル化複合体は0.75 μ g DNAを含有し、これは、正確に、このリボソームサンプルの外側にあると既知であるものに選択され

た。(1)の毒性は、非カプセル化複合体の毒性と匹敵することがわかった。サンプル(2)は、毒性の急激な減少を示し、そして、カチオン交換カラムによるこれらの複合体の除去に寄与し得る。

【0106】

図12は、カプセル化PEI/DNA複合体のインビボ毒性を例示する。75 μ g用量のDNAを有するカプセル化PEI/DNAを、4匹のマウスに注射し、そしてこれらの酵素(AST)レベルは、PBSコントロールのレベルと匹敵することがわかった。約4:1w/w割合のPEI/DNAの用量で、非カプセル化サンプルは、これらのマウスに対して致死量であった。このリボソーム注射におけるカプセル化効率は、ほぼ90%である。

【0107】

本明細書において記述した全ての刊行物、特許および特許出願は、個々の刊行物、特許または特許出願が本明細書中で参考として援用されるように具体的かつ個々に示されるのと同程度に、本明細書中で参考として援用される。

【0108】

本発明は、好ましい実施態様およびそれらの実施例を参照して説明されたが、本発明の範囲は、記載された実施態様のみに限定されない。当業者に明らかであるように、上述の発明の改変および適応が、添付の特許請求の範囲によって規定および範囲を定められた本発明の精神および範囲を逸脱することなくなされ得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、均一の小さなサイズのポリエチレンイミン-核酸複合体の構築を例示する。

【図2】

図2は、PEI-DNA複合体に対するデキストラン硫酸の効果を例示する。

【図3】

図3は、ピコグリーンに対して完全にDNAを曝露するに必要なデキストラン硫酸の最小量を決定するためのデキストラン硫酸の力価測定を例示する。

【図4】

図4は、DNAを定量するための標準曲線を例示する。各データ点において、デキストラン硫酸の標準量を加える。これは、複合体のランダムな試験サンプルに添加された量と同じである。

【図5】

図5は、その複合体の弛緩または解離が瞬間的な事象ではないことを例示する。

【図6】

図6は、デキストラン硫酸をそのアッセイに使用してPEIから核酸を解離させるときのカプセル化の程度を例示する。

【図7】

図7は、カプセル化効率を最適化するためのDOPSの力価決定を例示する。

【図8】

図8は、8モル%DOPSを含む脂質カプセル化されたPEI/DNAのサンプルのガウスサイズ分布を例示する。このリボソームは、代表的に、直径約75～約80nmである。

【図9】

図9は、カプセル化されたPEI凝縮DNAリボソームでのCos-7細胞のトランスフェクションー用量応答および時間経過を例示する。

【図10】

図10は、カプセル化されたPEI凝縮DNAリボソームでの種々の細胞株のトランスフェクションを例示する。LS-180は、デューク型結腸腺ガンを有する58歳の女性患者に由来する；SK-OV-3は、64歳からとったヒト卵巣腺ガン腫瘍である；U87は、ヒト神経膠芽細胞腫（glioblastoma）である；COS-7は、CV-1シミアン細胞から樹立した腎臓の線維芽細胞様細胞株である。この細胞は、SV40の起源欠損性変異体によって形質転換された；Lewis Lungは、ヒト肺ガン腫である；そしてB16はマウス黒色腫である。

【図11】

図11は、Cos-7細胞株におけるカプセル化されたPEI凝縮したDNAリボソームのインビトロ毒性を例示する。

【図12】

図12は、細胞死に対する、この凝縮剤-核酸複合体の濃度依存性を例示する。

【図13】

図13は、Lewis Lung腫瘍におけるPEI凝縮DNAリボソームのインビボ遺伝子発現を例示する。

【図14】

図14は、B16 i. p. 腫瘍におけるカプセル化されたPEI凝縮DNAの遺伝子発現を例示する。

【図15】

図15は、カプセル化されたPEI凝縮されたDNAリボソームの精製前および精製後のインビトロ毒性を例示する。

【図1】

Fig. 1

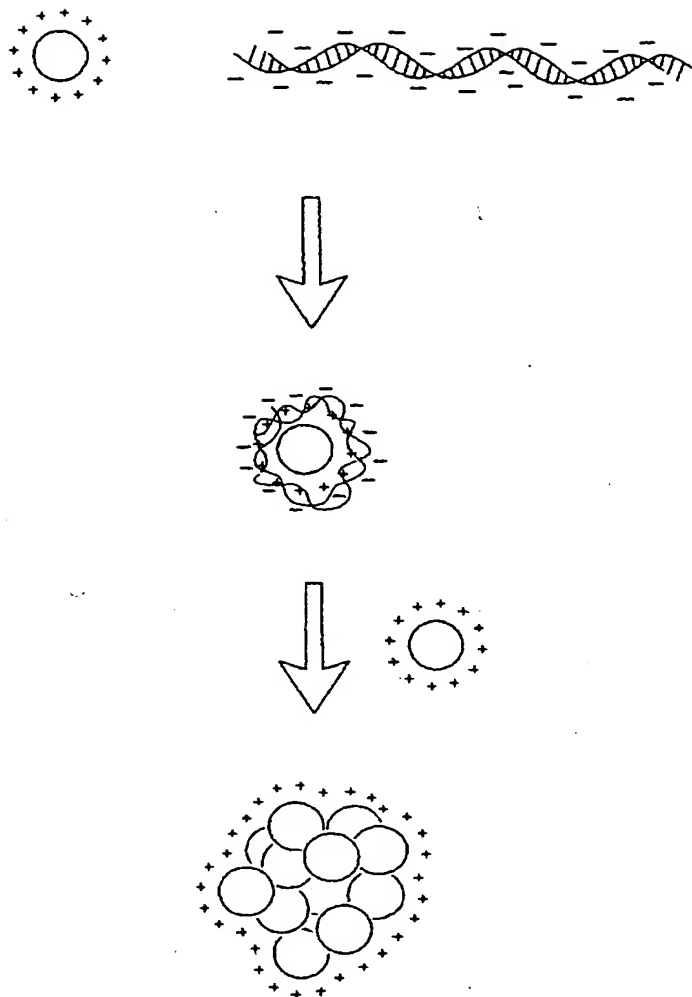
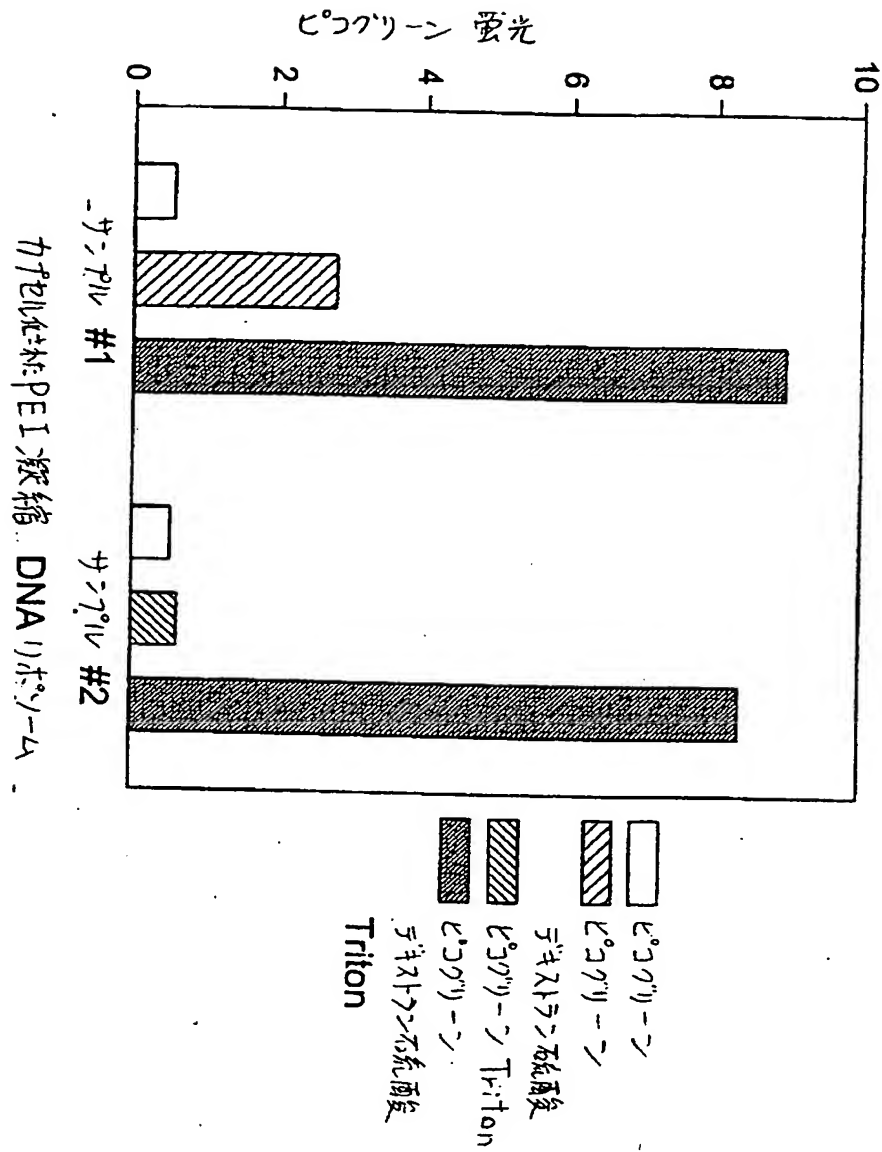
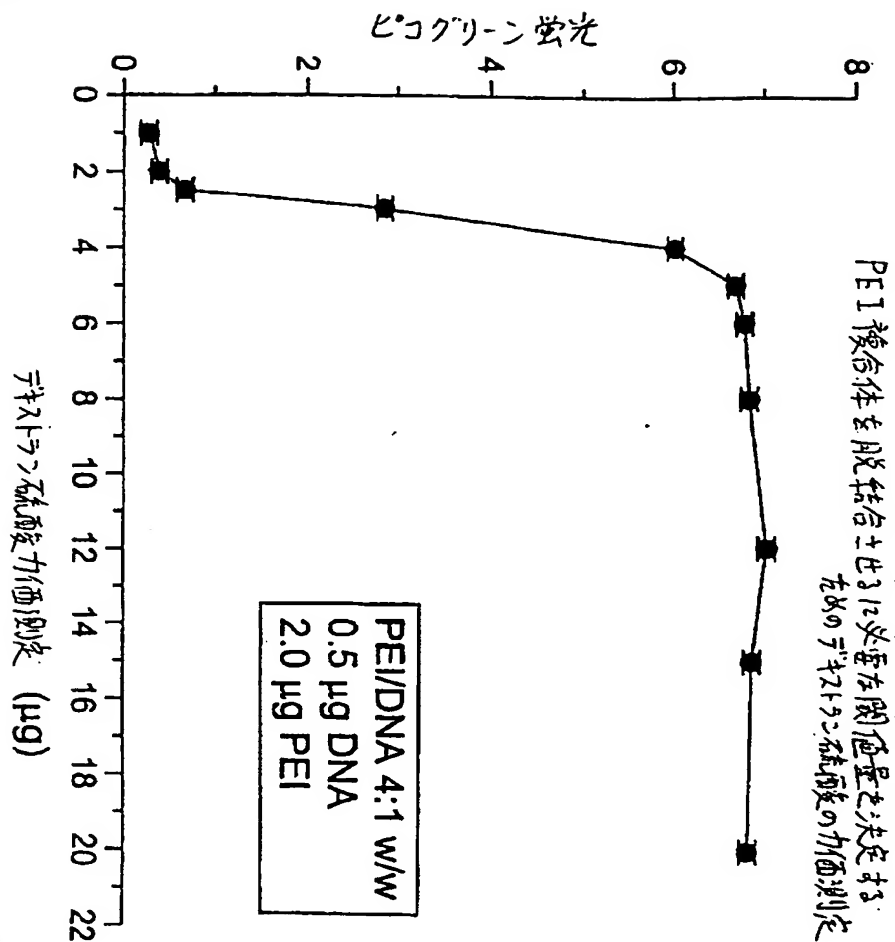


Fig. 2



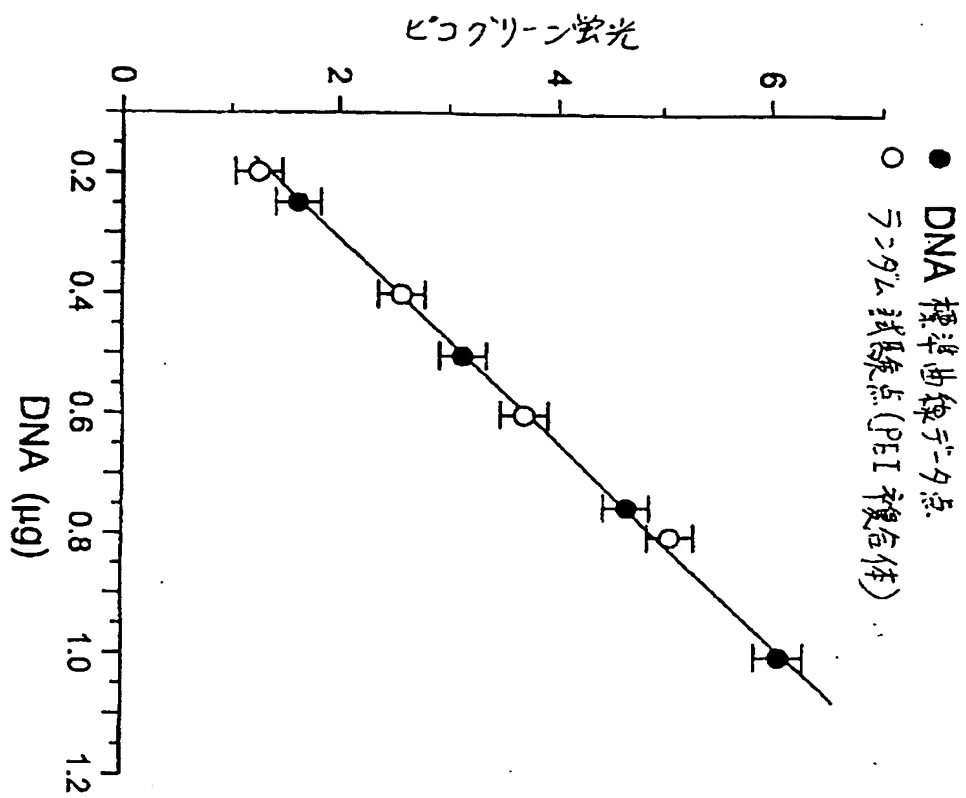
【図2】

Fig. 3



【図3】

Fig. 4



【図4】

【図5】

Fig. 5

デキストラン硫酸の添加が5の
PEIが5の代表的な時間的DNA放出

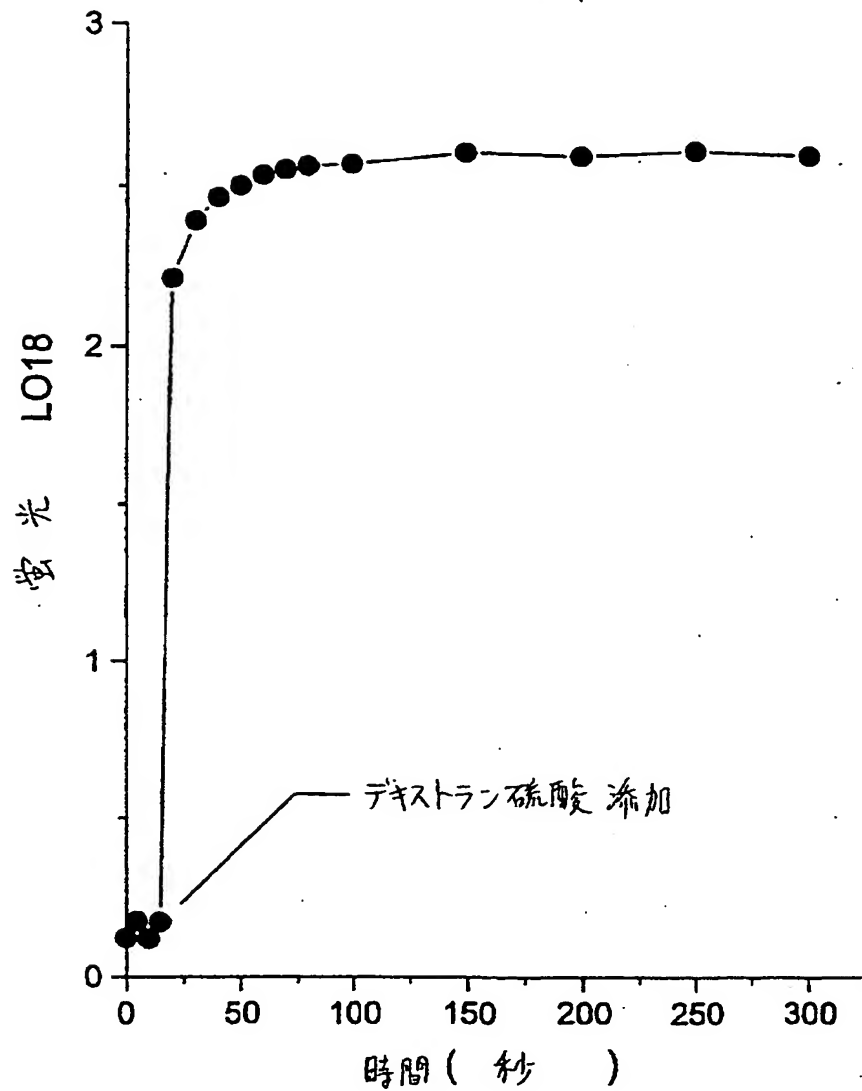
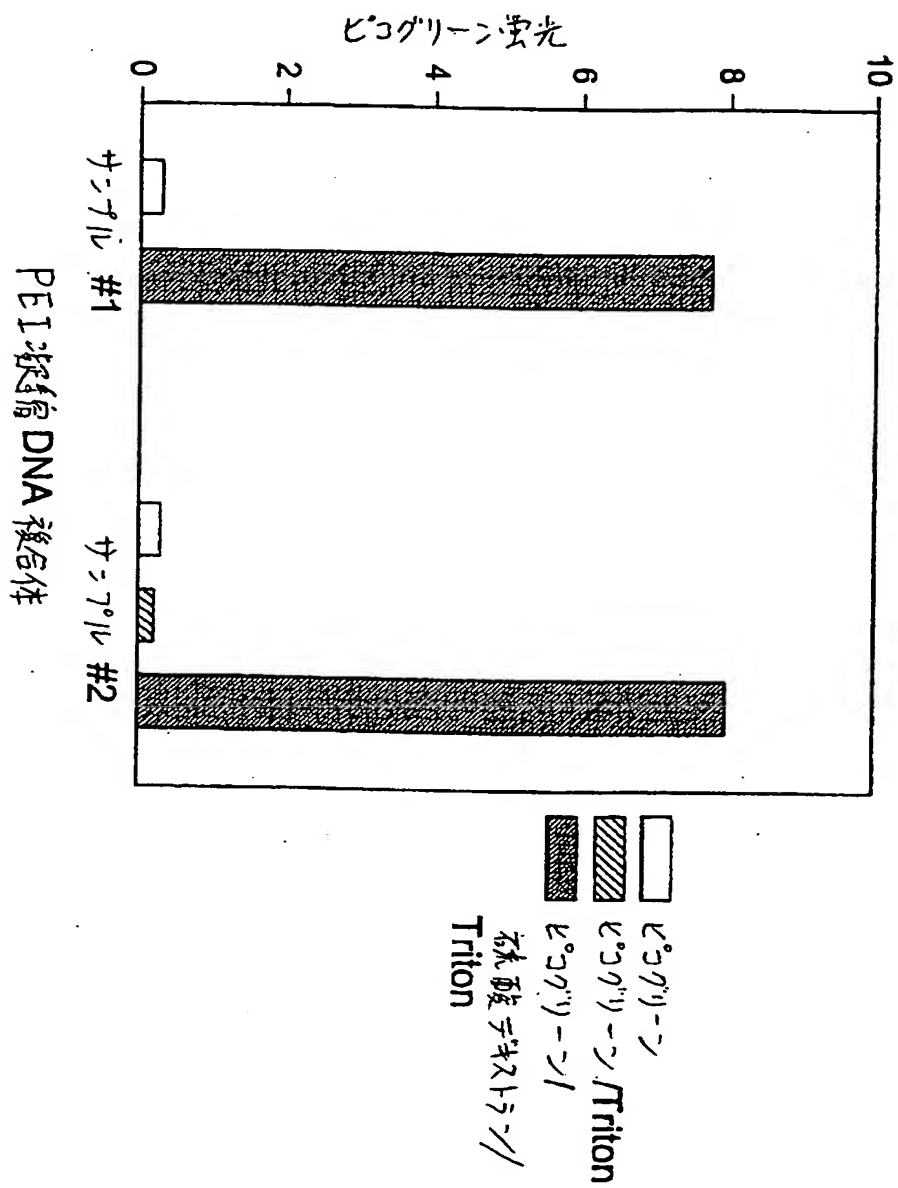


Fig. 6



【図6】

【図7】

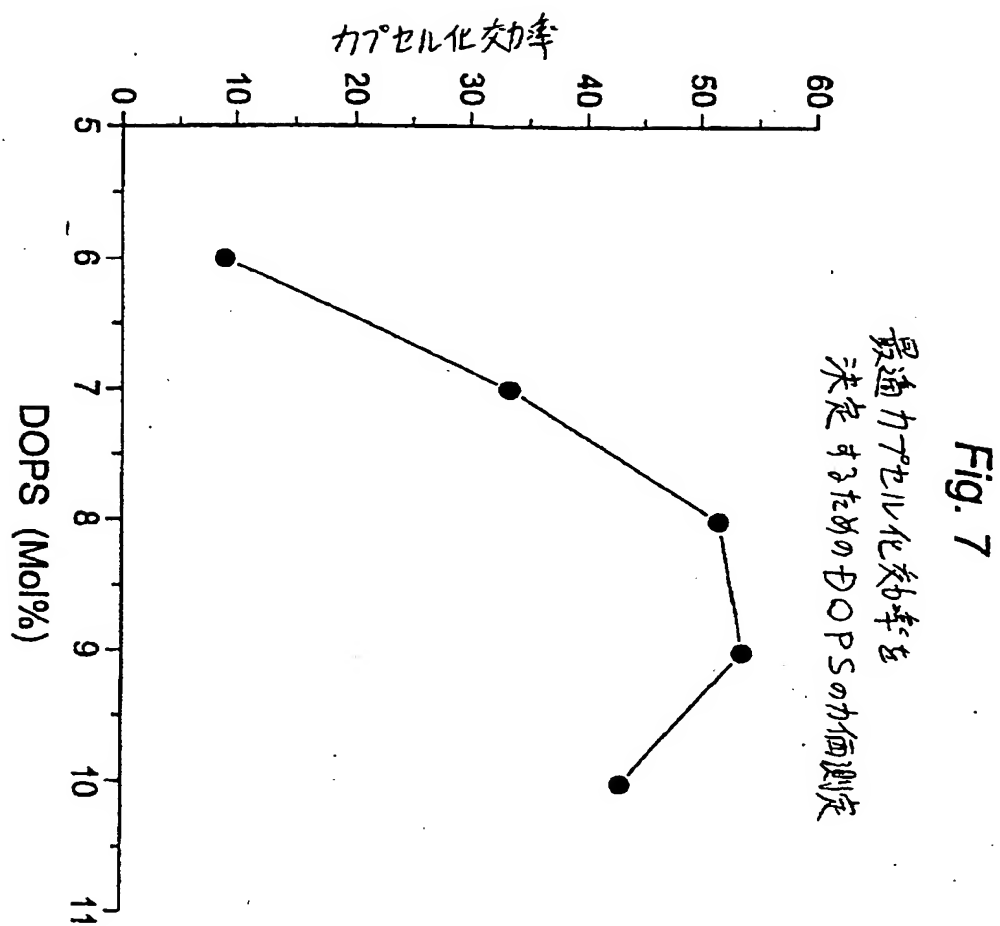
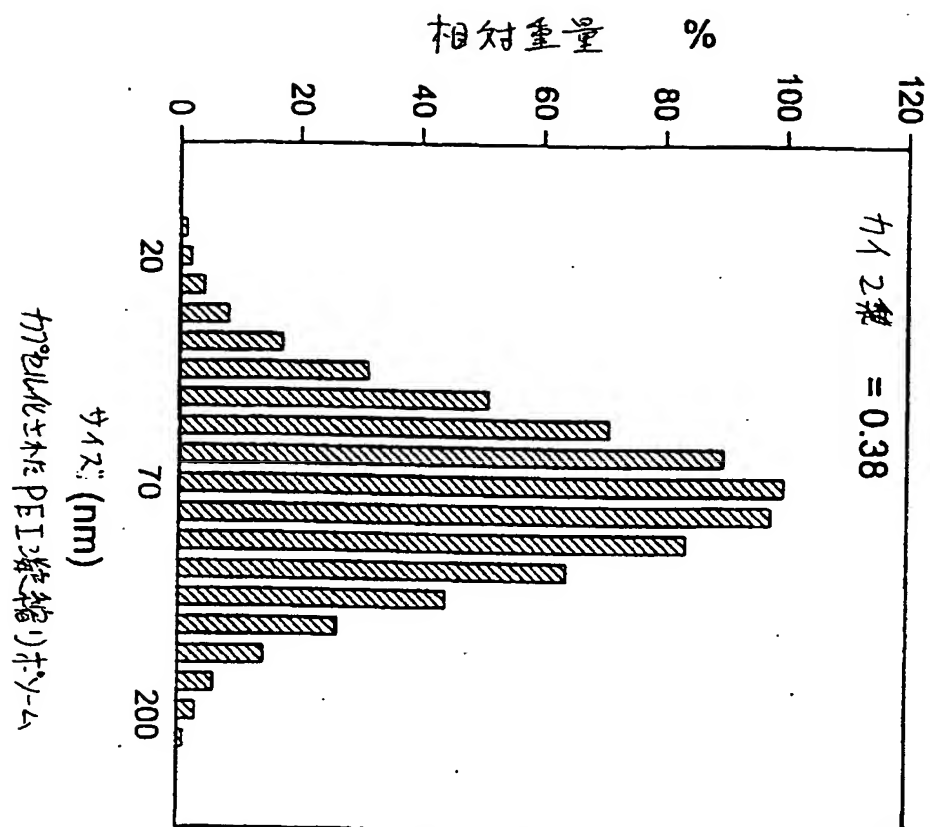


Fig. 8



【図8】

Fig. 9

カサセル化させたPEL濃縮リポリマー
COS-1細胞のトランスフェクション 用量反応カーブ 時間経過

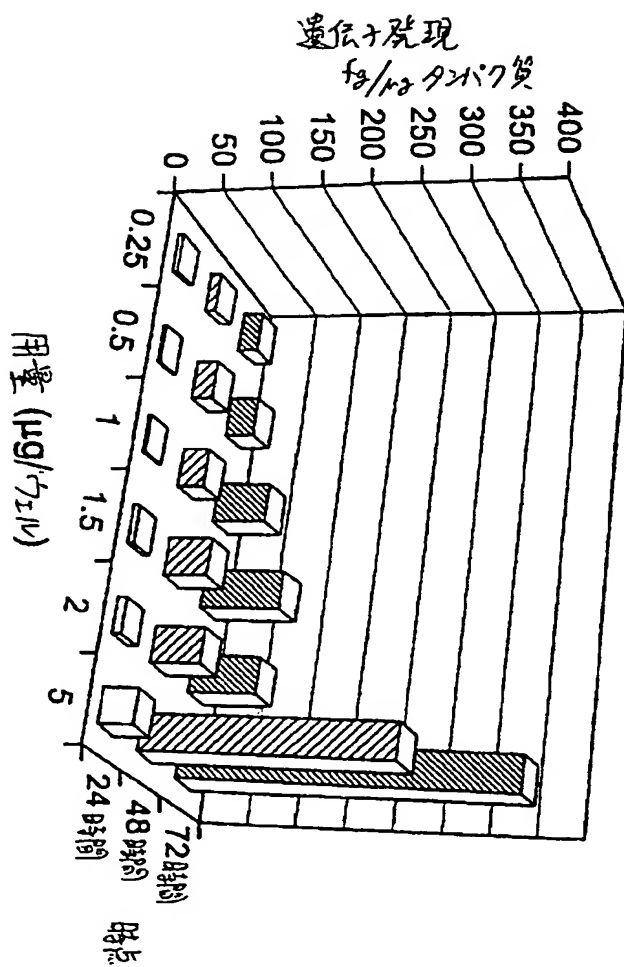
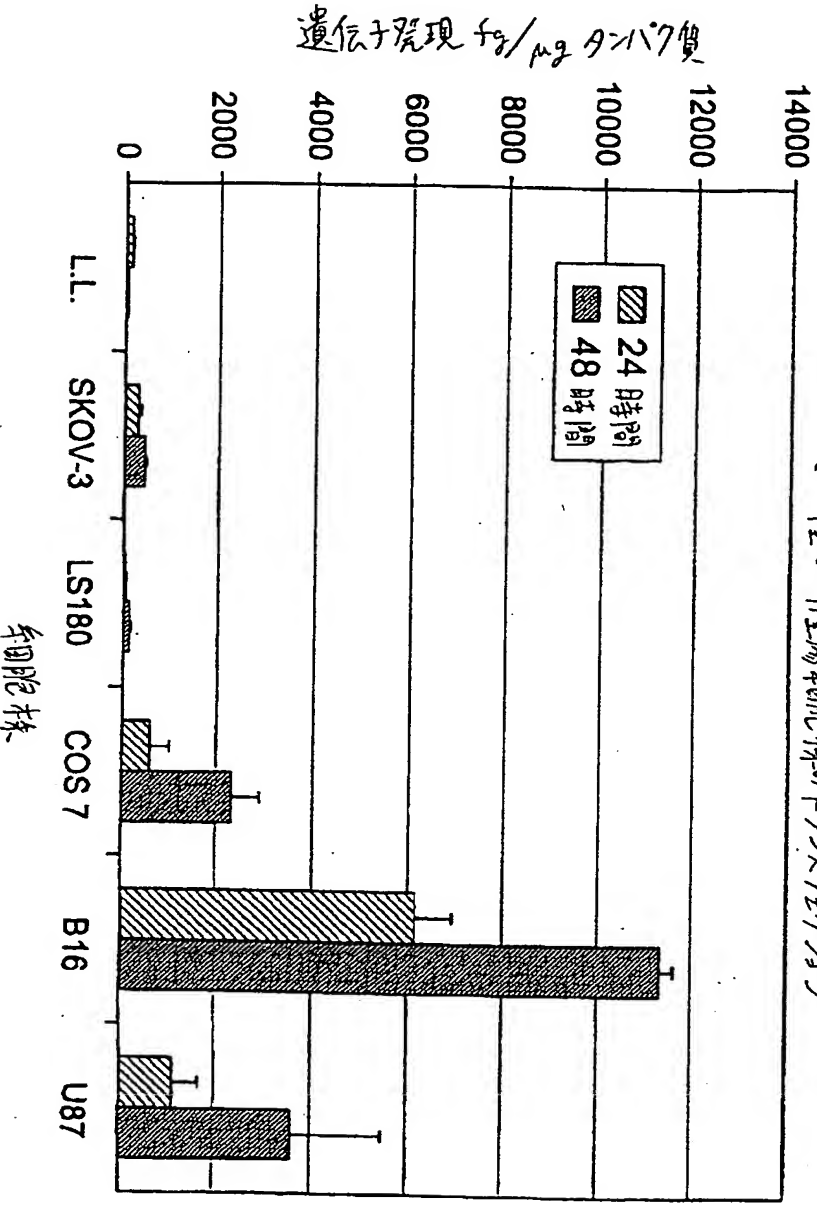


Fig. 10

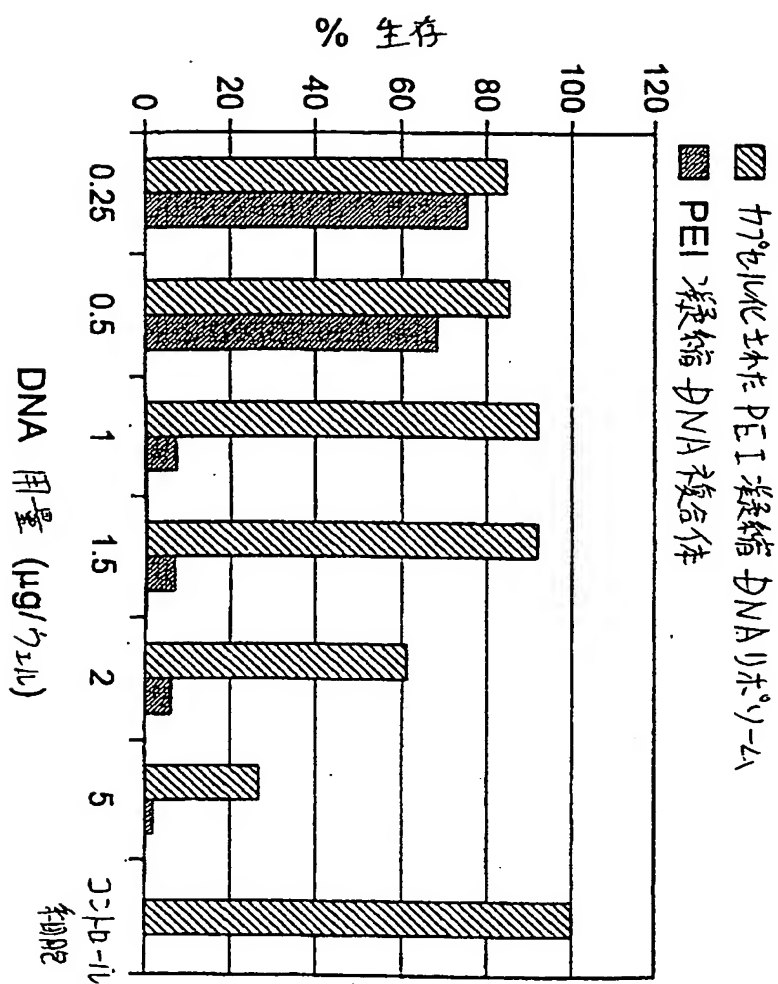
カチル化したPEI凝縮DNAリボソーム
で10倍20倍濃縮細胞のトランスフェクション



【図10】

Fig. 11

Cos-7 系細胞株におけるカゲル化された
PEI 凝縮 DNA リポソームの細胞毒性



【図11】

Fig. 12

コホ-ル



PEI/DNA 複合体



0.5 μ g

77 $^{\circ}$ セル化された
PEI/DNA 1 μ g

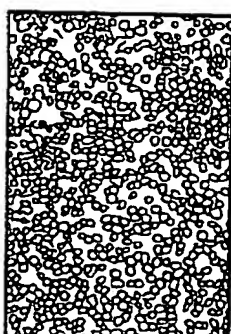


0.5 μ g

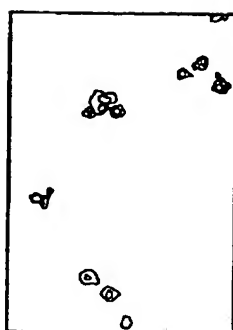
1 μ g



1 μ g



2 μ g

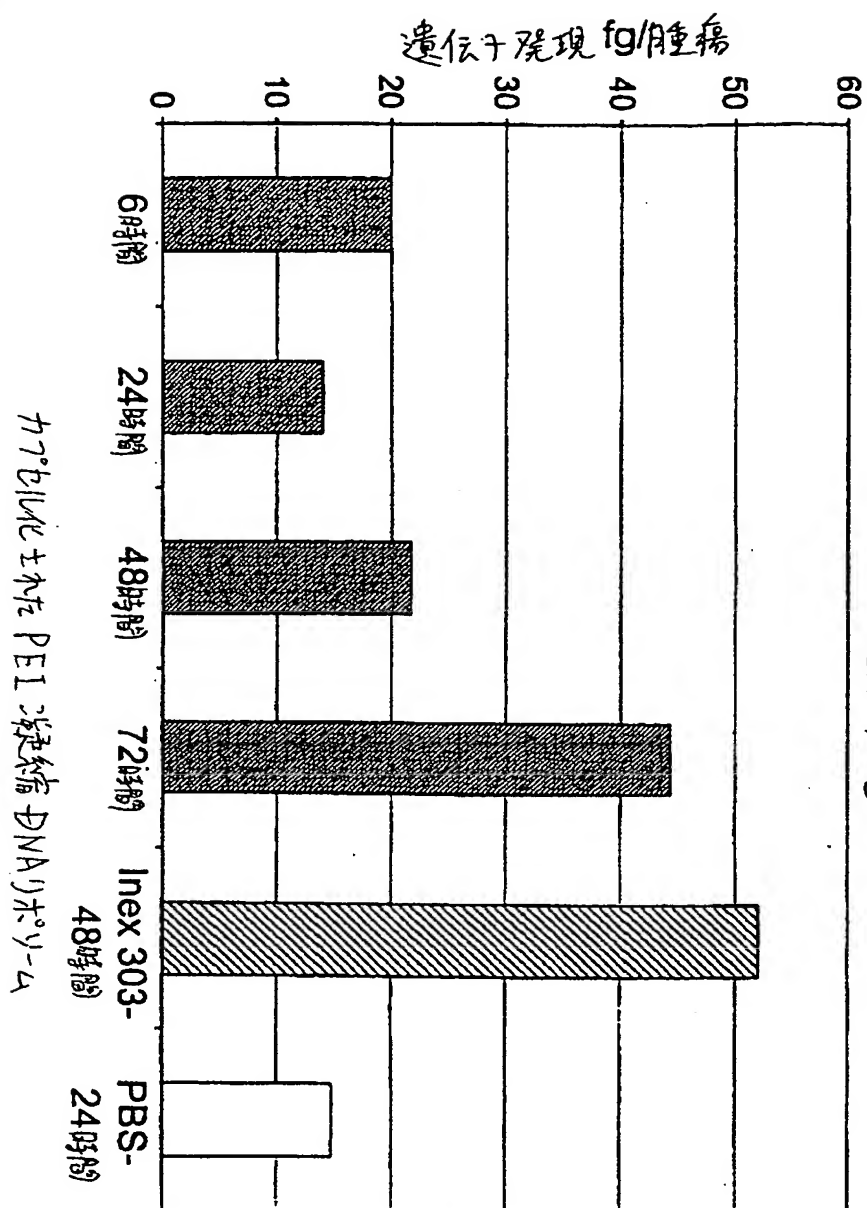


2 μ g



Fig. 13

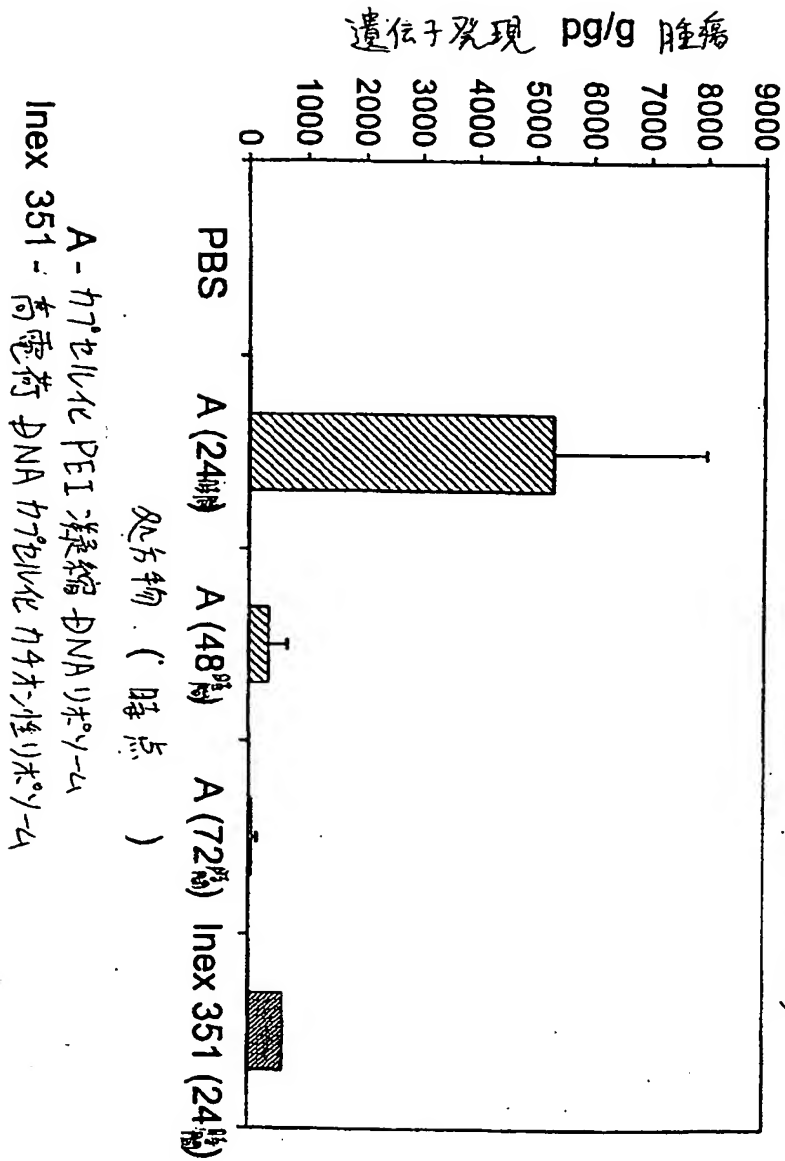
Lewis 肺癌腫瘍での PEI 凝縮ポリマーの
遺伝子発現



【図13】

Fig. 14

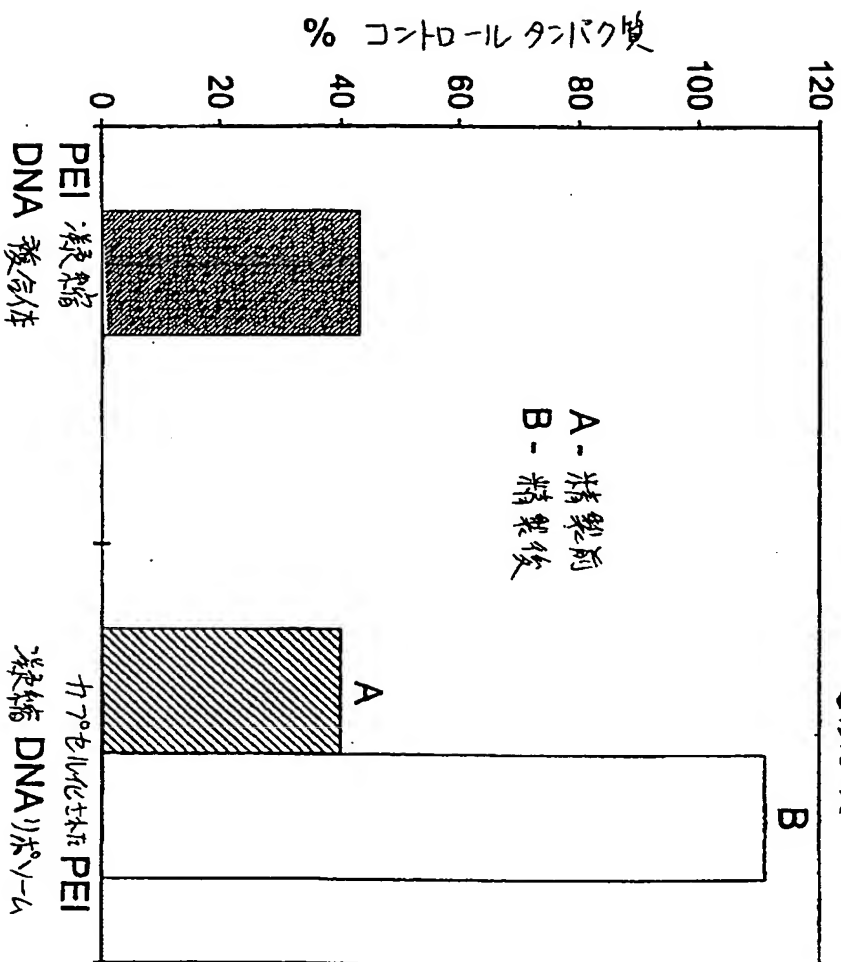
B16 i.p. 腫瘍におけるカゲル化された
PEI凝縮DNAの遺伝子発現 (i.p.注射)



【図14】

Fig. 15

カゲセル化されたPEI-凝縮DNAリボソム
精製前および精製後のインビトロ毒性比較



【図15】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern. Appl. Application No.
 PCT/US 99/16166

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K9/127 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 34647 A (VANDERBILT UNIVERSITY, U.S.A.) 21 December 1995 (1995-12-21) claims 1,2,4,5,9,11,15-17,19,20,22,23,27,30	1-54
X	WO 98 20857 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 22 May 1998 (1998-05-22) claims	1-66
X, P	WO 98 34648 A (RHONE-POULENC RORER) 13 August 1998 (1998-08-13) claims	1-66
E	WO 99 58694 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 18 November 1999 (1999-11-18) claims	1-66
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document reflecting to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 2000		Date of mailing of the international search report 16/03/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5010, 6000 Luxembourg NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3018		Authorized officer Scarponi, U

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 99/16166

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claims 32-54 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. Appl. No.

PCT/US 99/16166

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9534647 A	21-12-1995	AU 2773695 A	05-01-1996
WO 9820857 A	22-05-1998	AU 7177998 A	03-06-1998
		EP 0956001 A	17-11-1999
WO 9834648 A	13-08-1998	FR 2759298 A	14-08-1998
		AU 6298798 A	26-08-1998
		CZ 9902821 A	13-10-1999
		NO 993825 A	09-08-1999
		ZA 9801034 A	11-08-1998
WO 9958694 A	18-11-1999	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターコード (参考)
A 6 1 K 48/00		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	チェン, タオ カナダ国 ブイ64 1ゼット3 プリティッシュ コロンビア, リッチモンド, ミノーン ブールバード 9-7711		
(72)発明者	レング, エスター カナダ国 ブイ3ダブリュー 3エル6 プリティッシュ コロンビア, サリー, 88ティーエイチ アベニュー 14136		
(72)発明者	タード, ボール ジー. カナダ国 ブイ3エス 7エム6 プリティッシュ コロンビア, サリー, サンデル コート 19081		
(72)発明者	ウィーラー, ジェフリー ジェイ. カナダ国 ブイ34 8ジー9 プリティッシュ コロンビア, サリー, 17エイストリート 6179		
(72)発明者	ジュレール, ビーター カナダ国 ブイ6エイチ 2ティー5 プリティッシュ コロンビア, バンクーバー, パーチ 2664		
(72)発明者	グラハム, ロジャー カナダ国 ブイ6ケイ 1ゼット1 プリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェスト 7ティーエイチ アベニュー 2638		

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 DA03 EA04 GA13
HA17
4C076 AA19 CC41 CC50 DD01 DD46
DD49 DD52 DD63 DD70 EE17
EE23 EE26 EE41 FF16 FF21
FF31 FF43 FF67 FF68 GG41
4C084 AA13 MA24 NA13
4C086 AA01 AA02 EA16 MA03 MA05
MA24 NA13